

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



ESTUDO DE DIFERENTES VARIEDADES DE MILHO
UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE BROA

Maria Miguel Nunes Belo

MESTRADO EM CONTROLO DA QUALIDADE E TOXICOLOGIA
DOS ALIMENTOS

2011/2012

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



ESTUDO DE DIFERENTES VARIEDADES DE MILHO
UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE BROA

Maria Miguel Nunes Belo

Dissertação orientada pela Professora Doutora Maria do Rosário Beja Gonzaga Bronze
e pela Doutora Maria Carlota Morais e Cunha Vaz Patto

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa para
obtenção do grau de Mestre em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos

2011/2012

Agradecimentos

À Professora Doutora Maria do Rosário Bronze pela orientação, paciência, encorajamento, disponibilidade, apoio, conhecimentos científicos, dedicação e valiosas críticas construtivas e sugestões para realização deste trabalho. Um muito obrigado.

À Doutora Carlota Vaz Patto pela sua orientação, disponibilidade, atenção, contribuição imprescindível, sugestões e apoio durante o trabalho.

Ao Professor Luis Villas Boas, pela sua “incansável” disponibilidade, paciência e calma pela sua sabedoria, dedicação e contribuição para realização deste trabalho.

A todas as pessoas do laboratório de Química Analítica do ITQB/IBET um muito obrigado por serem a minha família ao longo deste tempo todo e por todos os momentos partilhados. Um especial e grande obrigado à Elsa Mecha pelo companheirismo, troca de saberes e especialmente pela sua extrema e incansável colaboração, dedicação e disponibilidade na realização deste trabalho. À Joaquina Antunes um obrigada por todos os nossos momentos, de boa disposição e pela sua constante disponibilidade e ajuda. Obrigada às duas por me aturarem, apoio e amizade.

Ao Professor Antero, pela sua amizade, preocupação, carinho e apoio.

À Doutora Carla Brites pela sua disponibilidade e material cedido na elaboração deste trabalho.

Ao projeto SOLIBAM financiado pela União Europeia :“Strategies for Organic and Low-input integrated Breeding and Management” (FP7-KBBE-2009-3, Grant Agreement Nº 245058) pela oportunidade de desenvolver este trabalho no âmbito do projeto bem como pelo financiamento. Ao projeto MOXI financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, PTDC/AGR-ALI/099285/2008: “Exploiting antioxidants, flavour and aromas diversity on “broa” bread maize breeding”, pelo financiamento do trabalho desenvolvido.

Ao ITQB/IBET pela utilização das instalações, equipamentos e material necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

À FCT pela utilização do equipamento de HPLC-MS/MS, adquirido no âmbito do projeto REDE/1518/REM/2005.

Ao laboratório de Nutracêuticos do ITQB, pela realização dos ensaios de atividade antioxidante.

A todas as equipas que contribuíram para a realização deste trabalho. Com um especial obrigado ao João Ferreira e à Ana Teresa Mata do laboratório LCLEM da FF, pela sua constante disponibilidade, ajuda e contribuição para realização deste trabalho.

À minha família, principalmente à minha mãe, pelo seu apoio incondicional, carinho, amor, confiança, incentivo, por sempre acreditar nas minhas capacidades e por proporcionar a minha formação académica. Muito obrigada, por todos os valores que me transmitiu, por ser o meu pilar e por ter feito de mim aquilo que sou hoje. Obrigada mãe.

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram e sempre acreditaram em mim. Fazem parte integrante de mim, da minha vida e daquilo que sou hoje. Um especial obrigado.

Às minhas grandes amigas e companheiras, Catarina Semedo que me acompanhou ao longo do meu percurso académico e à Rita Pereira, obrigada pela vossa incansável amizade, por serem minhas ouvintes, conselheiras e estarem sempre presentes na minha vida. Ao André Monho, meu grande amigo, um especial obrigada, por ter sido uma chave essencial na realização desta entrega, sem ele não teria sido possível.

A todos os Professores das cadeiras que frequentei, pelo conhecimento, formação e espírito crítico que me transmitiram.

Aos meus colegas de mestrado, que se tornaram uns amigos para mim. Obrigado por todos os momentos partilhados. Um especial obrigado ao Cassius Freitas, pela sua sempre boa disposição, amizade, disponibilidade, ajuda e contributos na realização deste trabalho.

Ao Gustavo Coelho, pela sua disponibilidade para as impressões deste documento. Um muito muito obrigado.

A todos o meu muito obrigado, por cada sorriso, palavra amiga, contribuição e carinho.

Glossário de abreviaturas e siglas

μL	microlitro
μm	micrómetro
AA	Atividade antioxidante
AAPH	(2',2'- Azobis (2-amidinopropano) dicloridrato
Ác.	Ácido
ACN	Acetonitrilo
AG	Ácido gálico
BPGV	Banco Português de Germoplasma Vegetal
c.d.o	Comprimento de onda
CAET	Capacidade antioxidante por equivalentes de Trolox
CAR	Carboxeno
CAT	Catequina
cm	Centímetro
DAD	Detetor de diodos
DCS	Extrato seco
DP	Desvio padrão
DPr	Desvio padrão relativo
DVB	Divinilbenzeno
ED	Detetor eletroquímico
EI	Impacto de eletrões
eq	Equivalentes
ESAC	Escola Superior Agrária de Coimbra
ESI	Ionização por “eletrospray”
EtOH	Etanol
eV	Eletrão volt
FL	Fluoresceína
FT	Fenóis totais

g	grama
g	Força centrífuga
GC	Cromatografia gasosa
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de massa
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia líquida de elevada eficiência
HPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de elevada eficiência acoplada à Espectrometria de massa Tandem
IBET	Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica
INIA	Instituto Nacional de Investigação Agronómica
IS	Índice de semelhança
ITQB	Instituto de Tecnologia Química e Biológica
LD	Limite de deteção
LDL	Lípidos de baixa densidade
LLE	Extração líquido-líquido
LQ	Limite de quantificação
LRI	Índice de retenção linear
M	Molar
m/v	Relação massa/volume
m/z	Relação massa/carga de um ião
MetOH	Metanol
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
MRM	Monitorização de reação múltipla
MS	Espectrometria de massa
nm	nanómetro
NP	Norma Portuguesa
°C	Grau centígrado
OPV	Variedades de polinização cruzada

p.a.	Pro análise
p.s.	Peso seco
p/v	Relação peso/volume
PA	Poliacrilato
PBS	Tampão fosfato
PDMS	Polidimetilsiloxano
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
Querc	Quercetina
RE	Rutina
RI	Índice de retenção
rpm	Rotações por minuto
S/A	Sem amostra
SFE	Extração com fluído supercrítico
SPME	Micro extração em fase sólida
Tr	Tempo de retenção
UITA	Unidade de Investigação Tecnológica Alimentar
USA	Estados Unidos da América
UV	Ultravioleta
V	Volts
v/v	Relação volume/volume
Vis	Visível
Ω	Ohm

Índice Geral

Agradecimentos	i
Glossário de abreviaturas.....	iii
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas.....	xiv
Resumo.....	xvi
Abstract	xviii
1 Introdução	2
1.1 Generalidades sobre o milho	2
1.2 O milho em Portugal e a produção de Broa	8
1.3 O projeto SOLIBAM e as amostras de milho em estudo	10
1.4 Compostos voláteis do milho	11
1.4.1 Análise de compostos voláteis	14
1.5 Compostos fenólicos do milho	16
1.5.1 Análise de compostos fenólicos	24
2 Objetivos do trabalho	27
3 Parte Experimental	29
3.1 Amostras em estudo e sua preparação.....	29
3.2 Análise de Compostos Voláteis por SPME-GC/MS.....	33
3.2.1 Preparação das amostras de farinha de milho para análise	34
3.2.2 Reagentes	35
3.2.3 Equipamento	35
3.2.4 Otimização das condições de análise	36
3.2.5 Condições de análise utilizadas.....	36
3.2.6 Tratamento de dados	36
3.3 Análise de Compostos Fenólicos por espectrofotometria e cromatografia	37
3.3.1 Preparação das amostras de farinha de milho para análise	38
3.3.1.1 Reagentes	38

3.3.1.2	Otimização das condições de análise.....	38
3.3.2	Determinação do teor em compostos fenólicos totais.....	39
3.3.2.1	Reagentes.....	39
3.3.2.2	Preparação das soluções stock.....	39
3.3.2.3	Preparação das soluções padrão de ácido gálico.....	39
3.3.2.4	Análise das amostras de farinha de milho	40
3.3.2.5	Equipamento	40
3.3.2.6	Tratamento de Resultados	41
3.3.3	Determinação dos flavonóides totais por espectrofotometria	41
3.3.3.1	Reagentes.....	41
3.3.3.2	Preparação das soluções stock.....	41
3.3.3.3	Preparação das soluções padrão de Catequina	42
3.3.3.4	Análise das amostras de farinha de milho	42
3.3.3.5	Equipamento	43
3.3.4	Análise dos compostos fenólicos por HPLC – DAD- ED	43
3.3.4.1	Preparação das amostras de farinha de milho.....	43
3.3.4.2	Reagentes.....	43
3.3.4.3	Equipamento	44
3.3.4.4	Condições de análise.....	44
3.3.4.5	Experiências relativas ao teor de fenóis totais.....	47
3.3.4.6	Análise de compostos fenólicos solúveis e insolúveis	50
3.3.5	Análise dos compostos fenólicos por HPLC-MS/MS: ensaios preliminares	53
3.3.5.1	Reagentes.....	53
3.3.5.2	Equipamento	53
3.3.5.3	Condições de análise	53
3.3.6	Determinação da atividade antioxidante.....	54
3.3.6.1	Reagentes.....	54
3.3.6.2	Método de ORAC.....	55
3.3.6.3	Método de HORAC	56
4	Resultados e Discussão	57
4.1	Análise de compostos voláteis nas amostras de farinha de milho	57
4.1.1	Otimização das condições de SPME	57

4.1.1.1	Escolha do revestimento da fibra de SPME	57
4.1.2	Otimização da preparação da amostra	65
4.1.2.1	Efeito da adição de água	65
4.1.2.2	Efeito da temperatura de extração	67
4.1.2.3	Efeito do tempo de extração.....	69
4.1.2.4	Estudo da repetibilidade da fibra	72
4.1.2.5	Estudo da presença de aldeídos na farinha de milho	73
4.1.3	Estudo de amostras de farinha de milho	76
4.2	Análise dos compostos fenólicos nas amostras de farinha de milho	86
4.2.1	Otimização do processo de extração de compostos fenólicos totais	86
4.2.2	Análise das amostras de farinha de milho	96
4.2.2.1	Quantificação dos compostos fenólicos totais por Folin Ciocalteu e por HPLC-DAD	96
4.2.2.2	Quantificação de flavonóides totais por espectrofotometria e por HPLC-DAD	112
4.2.2.3	Análise de compostos fenólicos solúveis e insolúveis	120
4.2.2.4	Identificação e quantificação de compostos fenólicos por HPLC-DAD	123
4.2.2.5	Análise das amostras por HPLC-ED	129
4.2.2.6	Atividade Antioxidante.....	133
4.3	Comparação das amostras.....	135
4.4	Análise das amostras por HPLC-MS/MS.....	143
5	Conclusões e trabalhos futuros	155
6	Referências Bibliográficas	159

Anexos

Índice de Figuras

Figura 1: Folha alargada do milho (www.wikipédia.pt)	2
Figura 2: Difusão cronológica do milho (<i>Zea mays L. ssp. mays</i>) desde a Meso – América até à Ásia (Desjardins&McCarthy, 2004)	3
Figura 3: Secção transversal de um grão de milho (Pomeranz (1987); legenda: 1-pericarpo, 2-epiderme, 3-mesocarpo, 4-células transversais, 5-células tubulares, 6-tegumento, 7-aleurona, 8- endoesperma vítreo, 9-endoesperma farináceo, 10- grânulo de amido na matriz proteica, 11-parede celular, 12-escutelo, 13-embrião, 14- grânulo de amido, 15- “tip cap”	4
Figura 4: a) Aspeto da broa tradicional (Brites, <i>et al.</i> , 2007), b) Aspeto da broa de Avintes (www.google.com), c) Aspeto da broa de Valdevez (www.google.com)	10
Figura 5: Grãos de diferentes variedades de milho correspondentes a amostras analisadas ...	11
Figura 6: Uso do dispositivo de SPME para a análise de compostos voláteis processo por GC (adaptada de Valente & Augusto, 1999)	16
Figura 7: Estrutura química de ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b).....	19
Figura 8: a) Estrutura química dos flavonóides (Adaptada de Heim, <i>et al.</i> , 2002); b) estrutura das diferentes classes de flavonóides	20
Figura 9: Propriedades biológicas dos compostos fenólicos (Adaptada de Zikta, <i>et al.</i> , 2011)...	22
Figura 10: Moinho utilizado para a obtenção da farinha de milho (moenda).....	32
Figura 11: Embalagens das diferentes farinhas de milho	33
Figura 12: GC/MS utilizado na análise de compostos voláteis.	35
Figura 13: Sistema de HPLC-DAD-ED utilizado	44
Figura 14: Esquema do procedimento de hidrólise adaptado de Mira <i>et al.</i> , 2008	52
Figura 15: Perfis cromatográficos de farinha de milho comercial obtidos por GC/MS com a fibra de DVB/Carboxen/PDMS, PDMS, PDMS/ DVB e PA nas condições experimentais descritas em 3.2.5.....	59
Figura 16: Sobreposição dos perfis cromatográficos de farinha de milho comercial obtidos por GC/MS em modo Split (5) e em modo Splitless com identificação dos picos correspondentes aos aldeídos.....	64
Figura 17: Variação da média da área total dos compostos obtida quando foram analisadas amostras (1g de farinha) às quais se adicionou quantidades diferentes de água e o desvio padrão (n=3).....	65
Figura 18: Variação da média da área total dos compostos obtida para cada quantidade de farinha testada (1,2,3 e 4g) adicionada a 2mL de água e desvio padrão (n = 3)	66

Figura 19: Sobreposição dos perfis cromatográficos de farinha comercial obtidos por GC/MS para cada temperatura de extração, bem como a numeração dos picos correspondentes aos aldeídos mencionados (farinha com água e tempo de extração de 60 minutos)	68
Figura 20: Variação da média da área total dos compostos obtida em função da temperatura de extração e o respetivo desvio padrão (n=3).....	69
Figura 21: Perfis cromatográficos obtidos para cada tempo de extração utilizando uma amostra de farinha comercial.....	Erro! Marcador não definido.
Figura 22: Variação da média da área total dos compostos em função do tempo de extração e o respetivo desvio padrão (n=3)	71
Figura 23: Variação da média da área dos compostos ao longo do ensaio sem acondicionamento entre análises (DPr= 16,88%)	72
Figura 24: Variação da área dos compostos ao longo dos ensaios; 1: com acondicionamento entre ensaios (n= 3, DPr =5,7 %); 2: sem acondicionamento entre ensaios, (n=3, DPr=0,53%)	73
Figura 25: Sobreposição dos perfis cromatográficos de farinha de milho comercial obtidos por GC/MS para 50°C, 60°C e 70°C, bem como a identificação dos compostos e o índice de semelhança	74
Figura 26: Variação da média da área total dos aldeídos ao longo dos ensaios de temperatura de extração bem como o desvio padrão (n=3), com tempo de extração de 60 minutos	75
Figura 27: Variação da média da área total dos aldeídos ao longo dos ensaios de tempo de extração (minutos) bem como o desvio padrão (n=3), com temperatura de extração de 60°C	75
Figura 28: Perfil cromatográfico característico de uma amostra de farinha de milho obtido por GC/MS (a identificação dos picos numerados encontra-se descrita na Tabela 15).....	77
Figura 29: Sobreposição dos perfis cromatográficos obtidos por GC/MS para a amostra com plástico e amostra sem plástico	79
Figura 30: Sobreposição dos perfis cromatográficos para armazenada em plástico à temperatura ambiente e armazenada em plástico à temperatura de -20°C	80
Figura 31: Sobreposição do perfil cromatográfico da amostra 44 com o perfil cromatográfico obtido para a mistura padrão C8-C20.	81
Figura 32: Área média obtida para os aldeídos identificados em cada variedade milho analisada	84
Figura 33: Áreas médias do total de aldeídos nas diferentes variedades de milho em termos de cor: variedade branca (n=24), variedade amarela (n=24), variedade amarela-alaranjada (n=3)	85
Figura 34: Reta de calibração do padrão ácido gálico. Medições feitas a 725nm e em 2 dias	87
Figura 35: Perfis cromatográficos obtidos por HPLC-DAD a 280nm para 20mg de farinha comercial com 10mL de EtOH/H ₂ O (50:50) (n=3)	88

Figura 36: Concentração de fenóis totais extraídos da farinha com os diferentes solventes extratantes e respetivo desvio padrão (n=3)	89
Figura 37: Comparação dos cromatogramas a 280nm obtidos para o extrato de farinha de milho preparado com diferentes extratantes.....	90
Figura 38: Comparação dos cromatogramas a 320nm obtidos para o extrato de farinha de milho preparado com diferentes extratantes.....	91
Figura 39: Comparação dos cromatogramas a 360nm obtidos para o extrato de farinha de milho preparado com diferentes extratantes.....	91
Figura 40: Perfil cromatográfico obtido para um extrato concentrado 20x de farinha comercial preparada em EtOH/H ₂ O (80%)	92
Figura 41: Sobreposição dos cromatogramas a 280nm obtidos com os dois programas de análise: método I e método II	93
Figura 42: Perfis cromatográficos da amostra comercial nos diversos c.d.o. obtidos com o método de análise I.....	94
Figura 43: Espectros de UV/Vis retirados da biblioteca de espectros do <i>software</i> Chromquest para as seguintes família: a) ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico, b) catequina, c) ácido clorogénico, d) quercetina 3 –glucósido.....	95
Figura 44: Retas de ácido gálico utilizadas para quantificar fenóis totais, traçadas em dias diferentes	97
Figura 45: Carta de controlo para o coeficiente de determinação (R^2) obtido para os diferentes dias de ensaios de calibração.....	97
Figura 46: Carta de controlo para o declive (m) obtido para os diferentes dias de ensaios de calibração	98
Figura 47: Carta de controlo para a ordenada na origem (b) obtida para os diferentes dias de ensaios de calibração	98
Figura 48: Sobreposição dos perfis cromatográficos obtidos por HPLD-DAD a 280nm de um extrato de farinha de milho nas diversas concentrações da experiência 1	101
Figura 49: Sobreposição dos perfis cromatográficos das amostras assinaladas na Tabela 23, obtidos por HPLC-DAD a 280nm; Legenda: Amostra 1, amostra 3, amostra 6, amostra 9, amostra 12, amostra 17, amostra 28 (assinalada no cromatograma) e amostra 32	108
Figura 50: Correlação para os teores de fenóis totais obtidos por ambas as técnicas de quantificação utilizadas.....	109
Figura 51: Teores médios de fenóis totais obtidos por espectrofotometria (Folin-Ciocalteu) para cada amostra (n=3)	110

Figura 52: Teores médios de fenóis totais obtidos por ambas as técnicas de quantificação para cada variedade: variedades amarelas-alaranjadas (n=3), variedades brancas (n=24), variedades amarelas (n=24)	111
Figura 53: Perfil cromatográfico de um extrato obtido por HPLC-DAD a 360nm.....	116
Figura 54: Comparação dos perfis cromatográficos a 360nm para as amostras com teor mais elevado de flavonóides totais: amostra 14, amostra 16, amostra 31 e amostra 38 e teor mais baixo: amostra 22 e amostra 32.....	117
Figura 55: Teores médios de flavonóides totais obtidos por espectrofotometria a 510nm para cada amostra (n=3)	119
Figura 56: Comparação do perfil cromatográfico a 280nm do extrato original de farinha de milho e respectivas fracções de ácidos fenólicos livres, conjugados e insolúveis.....	120
Figura 57: Comparação do perfil cromatográfico a 320nm do extrato original de farinha de milho e respectivas fracções de ácidos fenólicos livres, conjugados e insolúveis.....	121
Figura 58: Comparação do perfil cromatográfico a 360nm do extrato original de farinha de milho e respectivas fracções de ácidos fenólicos livres, conjugados e insolúveis.....	121
Figura 59: Comparação do perfil cromatográfico a 280nm obtido para a fração dos compostos fenólicos insolúveis e para o extrato original.....	122
Figura 60: Perfil cromatográfico caraterístico das amostras de farinha de milho obtido a 280nm com uma possível identificação de compostos fenólicos apresentada na Tabela 25	123
Figura 61: Teores médios obtidos por HPLC-DAD dos compostos identificados nas diferentes variedades de farinha de milho: variedade laranja (n=3), variedade branca (n=24) e variedade amarela (n=24) e respetivo DP.....	128
Figura 62: Sobreposição dos triplicados obtidos para uma amostra no detector de HPLC-DAD a 280nm e HPLC-ED, bem com a identificação do ácido ferúlico	130
Figura 63: Teores obtidos para as diferentes amostras, com o método de ORAC e HORAC.....	134
Figura 64: Projeção das amostras (47 amostras) e 4 variáveis em estudo (ORAC, teor de fenóis totais, flavonóides totais e flavonóis) no espaço definido pelos 2 primeiros componentes principais (variância total acumulada: 61,46%)	136
Figura 65: Projeção das amostras (47 amostras) e 6 variáveis em estudo (área individual de cada aldeído) no espaço definido pelos 2 primeiros componentes principais (variância total acumulada: 81,93%).....	137
Figura 66: Área total de compostos voláteis obtida para as diferentes variedades (n=40): broa (n=23), amíudo (n=4), VA (n=2), CV (n=3), Pigarro (n=4) e Fandando (n=2) e comparação com a média total, variedade Bulk 1990/91 e variedade americana, BS22	140

Figura 67: Teor de fenóis totais obtido para as diferentes variedades (n=40): broa (n=23), amíudo (n=4), VA (n=2), CV (n=3), Pigarro (n=4) e Fandando (n=2) e comparação com a média total, variedade Bulk 1990/91 e variedade americana, BS22	141
Figura 68: AA obtida para as diferentes variedades (n=14): broa (n=9), amíudo (n=2), VA (n=2) e comparação com a média total, variedade Bulk 1990/91 e variedade húngara NDB	142
Figura 69: Espectro de Massa do extrato de farinha de Milho no modo MS Scan (m/z 40-600) em ESI ⁺ , após infusão direta	144
Figura 70: Espectro de Massa do extrato de farinha de Milho no modo MS Scan (m/z 40-600) em ESI ⁻ , após infusão direta	144
Figura 71: Cromatograma do ião extraído do extrato de farinha de milho (Amostra 11) em modo Scan ESI ⁻	146
Figura 72: Cromatogramas obtidos no detetor de díodos nos diferentes c.d.o para o extrato de farinha de milho	146
Figura 73: Cromatogramas dos iões extraídos do extrato de farinha de milho em modo Scan ESI, correspondentes aos iões pesquisados e detetados.....	149
Figura 74: Sobreposição do perfil cromatográfico do extrato obtido por HPLC-DAD a 280nm e a mistura (mix) padrão 1 ; Legenda: 1-ácido gálico, 2- ácido protocatechuico, 3- ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico, 4- ácido vanílico, 5-ácido cumárico, 6-Procyanidina B2, 7- ácido ferúlico, 8- ácido cinâmico, 9- canferol	150
Figura 75: Sobreposição do perfil cromatográfico do extrato obtido por LC-DAD a 280nm e mistura (mix) padrão 2; Legenda: 10- ácido caféico, 11-vanilina, 12- siringaldeído, 13- Canferol-3-glucósido, 14- ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico, 15- quercetina, 16- hesperidina	151
Figura 76: Cromatograma obtido em modo MRM na análise do extrato concentrado de farinha de milho (Amostra 36)	153

Índice de tabelas

Tabela 1: Distribuição média das partes principais do grão de milho (Tabela adaptada da FAO, 1993: www.fao.org -“Structure of the maize kernel”).....	4
Tabela 2: Alimentos tradicionais fabricados com farinha de milho e sub-produtos da moagem seca do milho (Adaptada de Rooney & Serna-Saldivar, 2003).....	7
Tabela 3: Classes de compostos fenólicos presentes em plantas (Adaptada de Balasundram, <i>et al.</i> , 2006; Angelo & Jorge, 2007)	18
Tabela 4: Identificação das amostras analisadas no âmbito do projeto SOLIBAM.....	29
Tabela 5: Concentração dos padrões e respetivos volumes. Nota: Completou-se o volume de cada balão com uma solução de H ₂ O/MetOH (20:80).....	40
Tabela 6: Concentração dos padrões e respetivos volumes. Nota: Completou-se o volume de cada balão com H ₂ O ultra pura	42
Tabela 7: Programa de eluentes ao longo da análise no HPLC (método I).....	45
Tabela 8: Programa de eluentes ao longo da análise no HPLC (método II).....	45
Tabela 9: Programa de eluentes ao longo da análise no HPLC (método III).....	46
Tabela 10: Condições de deteção no detetor de díodos	46
Tabela 11: Registo dos volumes pretendidos ao longo da concentração do extrato.....	48
Tabela 12: Diluições aplicadas nos extratos preparados	48
Tabela 13: Programa de eluentes ao longo da análise de no HPLC- MS/MS.....	54
Tabela 14: Tempo de retenção, índice de semelhança, biblioteca de espectros e aroma característico dos compostos identificados na farinha de milho comercial	60
Tabela 15: Identificação de compostos nas amostras de farinha de milho. Extração feita durante 60min a 60°C com uma fibra DVB/CAR/PDMS.....	78
Tabela 16: Identificação dos compostos da mistura padrão de hidrocarbonetos, com respetivo tempo de retenção e índice de retenção linear (LRI).....	82
Tabela 17: Compostos voláteis possivelmente identificados em GC/MS e identificados pela biblioteca de espectros de massa e LRI	83
Tabela 18: Concentração de compostos fenólicos no extrato de farinha comercial.	87
Tabela 19: Família de compostos fenólicos e respetivos c.d.o. a que absorvem	95
Tabela 20: Teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu obtidos para as diversas experiências	100
Tabela 21: Teor de fenóis totais nos diferentes extratos da experiência 1, obtidos nos dois métodos de quantificação.....	102
Tabela 22: Análise estatística pelo teste da Anova (fator único).....	104

Tabela 23: Teores médios de fenóis totais (mg AG/100g p.s.) para cada amostra, obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu e por HPLC-DAD.....	105
Tabela 24: Teor médio de fenóis totais e flavonóides totais obtidos pelos dois métodos de quantificação (Espectrofotometricamente e HPLC-DAD).....	113
Tabela 25: Tempo de retenção, c.d.o. máximo de absorção e identificação para cada um dos compostos nas amostras de milho.....	124
Tabela 26: Teores médios dos compostos identificados por HPLC-DAD nas amostras.....	126
Tabela 27: Tempo de retenção e espectros obtidos pelo <i>software</i> Chromquest para cada pico com sinal no eletroquímico.....	131
Tabela 28: Valores obtidos para a atividade antioxidante (AA) para o método de ORAC e HORAC.....	133
Tabela 29: Nº de amostra referenciada nas Figura 66, 67, 68 e respetivo genótipo	139
Tabela 30: Iões moleculares presentes na amostra de farinha de milho, bem como o tempo de retenção e c.d.o. máximo para cada ião	147
Tabela 31: Iões moleculares pesquisados no extrato de farinha de milho, segundo Arranz&Calixto (2010) bem como a sua respetiva identificação	147
Tabela 32: Padrão correspondente a cada mistura padrão, bem como o tempo de retenção e as transições que apresentam.....	152
Tabela 33: Compostos identificados no extrato de farinha, bem como o tempo de retenção e a transição que apresentam	153

Resumo

O milho (*Zea mays L.*) é um dos cereais mais importantes no mundo, representando 31% da produção total de cereais. O milho chegou a Portugal no século XVI e é amplamente utilizado na produção de broa de milho, elaborada com mais de 50% de farinha de milho sendo muito consumida nas zonas norte e centro do país. Do ponto de vista nutricional os cereais são o grupo da roda dos alimentos cuja proporção de ingestão diária (4 a 11 porções) deverá ser superior à dos outros grupos. São alimentos muito importantes para a saúde e consequente prevenção de doenças (tem sido reconhecido o seu potencial antioxidante, anticarcinogénico, anti-inflamatórios, entre outros). As propriedades biológicas estão associadas a compostos bioativos, nomeadamente os compostos fenólicos. Sensorialmente e em conjunto com compostos voláteis, estes compostos são os responsáveis pelo *flavour* característico de milho e produtos derivados do milho. Assim os compostos voláteis presentes no milho podem condicionar as características organolépticas de produtos como a broa de milho e podem ser responsáveis pelas preferências dos consumidores e consequentemente as escolhas dos industriais deste setor. Embora existam alguns estudos sobre compostos voláteis em produtos de milho, a complexidade da análise do aroma devido aos baixos teores de compostos voláteis e pelo fato de pertencerem a diferentes famílias, podem explicar a escassez de estudos.

O trabalho que se apresenta enquadra-se no âmbito do projeto europeu SOLIBAM que visa a avaliação das variedades tradicionais que servirão de base para o desenvolvimento de novas estratégias na agricultura para a criação e gestão de plantas de milho na Europa e África subsaariana. Procedeu-se assim à análise de 51 variedades de milho: 49 variedades portuguesas e 2 variedades americanas. Numa fase inicial do trabalho procedeu-se à implementação e otimização das metodologias a usar. A Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC/MS) foi a técnica usada para analisar a composição volátil. A determinação de compostos fenólicos totais, foi realizada por espectrofotometria, bem como a determinação de flavonóides e para determinar os compostos fenólicos individualmente analisaram-se as amostras por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) associada a vários modos de deteção. Com vista à identificação e quantificação de compostos fenólicos realizaram-se ensaios

preliminares por HPLC-MS/MS. A atividade antioxidante das amostras foi medida pelo método de ORAC e HORAC.

Nas diferentes variedades de milho analisadas, os aldeídos foram os principais compostos voláteis detetados, nomeadamente o hexanal, o heptanal, o 2-heptanal, o 2-octenal, o nonanal, 2-nonenal (E) e o decanal. O teor de fenóis variou entre 109,62±4,12 a 206,83±9,55 mg equivalentes de ácido gálico (AG) /100g milho p.s., para os flavonóides totais entre 1,47±0,15 a 38,91±1,47 mg equivalentes de catequina/100g milho p.s. e para os flavonóis de 10,47±1,98 a 36,23±3,11mg eq de quercetina/100 g milho p.s. Os valores de atividade antioxidante variaram entre 782,85±4,62 a 2629,33±160,63µmol CAET/100g milho p.s. A técnica de HPLC-DAD permitiu detetar a presença de ácidos hidroxicinâmicos, tais como o *p*-cumárico e o ácido ferúlico. Pela análise por HPLC-MS/MS em modo MRM confirmou-se a presença do ácido *p*-cumárico e identificou-se o ácido protocatechuico, hidroxibenzóico, cafeico e a apigenina nos extratos de farinha de milho. Por Scan em modo negativo detetaram-se iões moleculares correspondentes ao ácido ferúlico, cafeoilquínico e sinápico.

A partir das experiências de hidrólise das amostras concluiu-se que a maior parte dos compostos fenólicos se encontra na forma insolúvel na farinha de milho.

Das diversas variedades analisadas, as variedades tradicionais que foram recolhidas na região centro do país (região conhecida pela qualidade da sua broa de milho) surgem destacadas na maior parte dos parâmetros analisados, em relação às restantes amostras.

Apesar da importante contribuição do presente estudo na caracterização química de diferentes variedades de milho, muito trabalho deverá ainda ser. Alguns ensaios realizados mostraram que deverá haver algum cuidado na preparação de amostras para futuros ensaios nomeadamente no que se refere a possíveis contaminações com material de embalagem (plástico) e a problemas no processo de concentração dos extratos a usar na análise por HPLC. O trabalho desenvolvido nesta tese, entre outros aspectos, permitiu chamar a atenção para alguns aspetos do trabalho experimental que podem condicionar a qualidade final dos resultados obtidos.

Palavras chave: *Zea mays* L., Broa de milho, variedades tradicionais, SOLIBAM, compostos voláteis, compostos fenólicos, GC/MS, HPLC-DAD-ED, Atividade antioxidante, HPLC-MS/MS.

Abstract

The maize (*Zea mays* L.) is one of the most important cereal on the world, representing 31% of total cereal production. Corn arrived in Portugal in the sixteenth century and is widely used in the production of corn bread, made with more than 50% of maize meal and is very consumed in the northern and central provinces.. From a nutritional point cereals are the group of food wheel whose proportion of daily intake (4-11 parts) should be greater than the other groups. Foods are very important for the health and consequent prevention of diseases (antioxidant, anticarcinogenic, anti-inflammatory effects, among others). The biological properties are associated to bioactive compounds, such phenolic compounds. Sensory and together with the volatile compounds, the compounds are responsible for the characteristic flavor of maize and maize products. Thus the volatile compounds present in maize might influence the organoleptic characteristics of products such as maize bread and maybe be responsible for consumer preferences and hence choices of this industrial sector. Although the existence of some volatile compounds studies in maize products, the complexity of analysis of aroma due to the low levels of volatile compounds and the fact that they belong to different families, may explain the lack of studies.

This work falls within the SOLIBAM European project aimed at evaluation of traditional varieties as a basis for developing new strategies in agriculture for the creation and management of maize plants in Europe and sub-Saharan Africa. This was done to the analysis of 51 varieties of maize: 49 Portuguese varieties and 2 American varieties.

Initially work proceeded to the implementation and optimization of methods to use. The gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) technique was used to analyze the volatile composition. The determination of total phenolic compounds was performed by spectrophotometric assay and the determination of flavonoids and phenolic compounds to determine the individual samples were analyzed by High Performance Liquid Chromatography associated with different modes of detection. For the identification and quantification of phenolic compounds is carried out by preliminary tests performed by HPLC-MS/MS. The antioxidant activity of samples was measured by ORAC and HORAC.

In the different varieties of maize analyzed, the aldehydes were the major volatile compounds detected, and in particular hexanal, the heptanal, 2-heptanal, 2-octenal,

the nonanal, 2-nonenal (E) and decanal. The phenolic content ranged from 109,62±4,12 a 206,83±9,55mg galic acid equivalents (AG)/100g corn dry weight (DW), for the total flavonoids from 1,47±0,15 a 38,91±1,47 mg eq of catequin/100g corn DW and flavonols of 10,47±1,98 a 36,23±3,11 mg eq of quercetin/100 DW values of antioxidant activity range from 782,85±4,62 a 2629,33±160,63µmol CAET/100g of corn DW. With HPLC-DAD was possible to detect the presence of hydroxycinnamic acids such as *p*-coumaric and ferulic acid. For analysis by HPLC in MRM mode confirmed the presence of *p* -coumaric acid and identified the protocatechuic acid, hydroxybenzoic, caffeic and apigenin in extrats of maize. In negative Scan mode was also detected the presence of molecular ions corresponding to the ferulic acid, sinapic and caffeoylquinic. From the experiments of hydrolysis of samples was concluded that most of the phenolic compounds in maize were in the insoluble form.

The varieties analyzed, traditional varieties have been collected in the central region (a region known for the quality of their corn of bread) appear highlighted in most parameters.

Although the contribution of the present study the chemical characterization of different genotypes of corn, much work has yet to be carried out to characterize the sample in terms of volatile compounds and phenolics. Some experiments carried out show that there should be some caution in the preparation of samples for future testing and in particular with regard to possible contamination by packaging material (plastic) and problems in the concentration of the extracts to be used in HPLC analysis. The work in this thesis thus enabled to draw attention to some aspects of experimental work that determine the final quality of the results obtained.

Key words: *Zea mays* L., Corn bread, traditional varieties, SOLIBAM, volatile compounds, phenolic compounds, GC/MS, HPLC-DAD-ED, antioxidant activity, HPLC-MS/MS.

CAPÍTULO I

1 Introdução

1.1 Generalidades sobre o milho

O milho (*Zea Mays* L. ssp. *Mays*) é membro da família das gramíneas (*Gramineae*), planta de grande porte que pode alcançar até 2,5m de altura e é dotada de um amplo sistema radicular fibroso (FAO, 1993). É uma planta monóica que se reproduz por polinização cruzada, as folhas apresentam uma forma alargada (Figura 1) e é na maçaroca que se desenvolve o grão (Tilman, *et al.*, 2002; Brites, *et al.*, 2007).



Figura 1: Folha alargada do milho (www.wikipédia.pt)

A palavra “milho” tem origem indígena e significa “aquilo que sustenta a vida”. Nas civilizações Maia e Asteca desempenhou um papel importante nas suas crenças religiosas, festividades e nutrição. É milho em Português, *maïs* em Francês, *maize* ou *corn* em Inglês, *maheende*, *mase* ou *mahindi* no norte da África central, *surratul-Makkah* em árabe, *Makka* em hindu, entre outros (Brites, *et al.*, 2007).

Sobre a origem exata desta planta pouco se conhece ainda, no entanto Doebley (2004) refere que o milho atual deriva do teosinto (*Zea mays* ssp. *Parviglumis* & *Mexicana*), uma subespécie mexicana, devido à proximidade genética entre ambas (Brites, *et al.*, 2007). Difundiu-se desde Espanha e Portugal até locais de clima mais temperado do Mediterrâneo (Itália e Sul de França) e posteriormente à Europa Setentrional. Os comerciantes e navegadores portugueses contribuíram para a difusão do milho na África e Ásia em 1580 (Desjardins&McCarthy, 2004) e assim em menos de 300 anos o milho chegou à Ásia desde a Meso-América (Figura 2) e devido às suas

qualidades nutricionais estabeleceu-se como um importante cultivo para a alimentação humana ou ração de animais.

A cultura do milho é das culturas, economicamente, mais importante dos Estados Unidos, com aproximadamente 40% da sua produção global (Brites, *et al.*, 2007) e a terceira planta de cultivo mais importante (depois do arroz e trigo) em todo o mundo (Frova, *et al.*, 1999; Pedreschi & Cisneros – Zevallos, 2007). A sua produção mundial foi estimada em 844 milhões de toneladas em 2010 (FAOSTAT, 2012) e pode ser feita em todas as regiões do mundo (FAO 1993) a partir de 58º de latitude norte (Canadá e Rússia), 40ºC de latitude sul (Argentina e Chile) abaixo do nível do mar na planície do Cáspio e a mais de 4000m de altitude nos Andes peruanos (FAO 1993) (Figura 2).

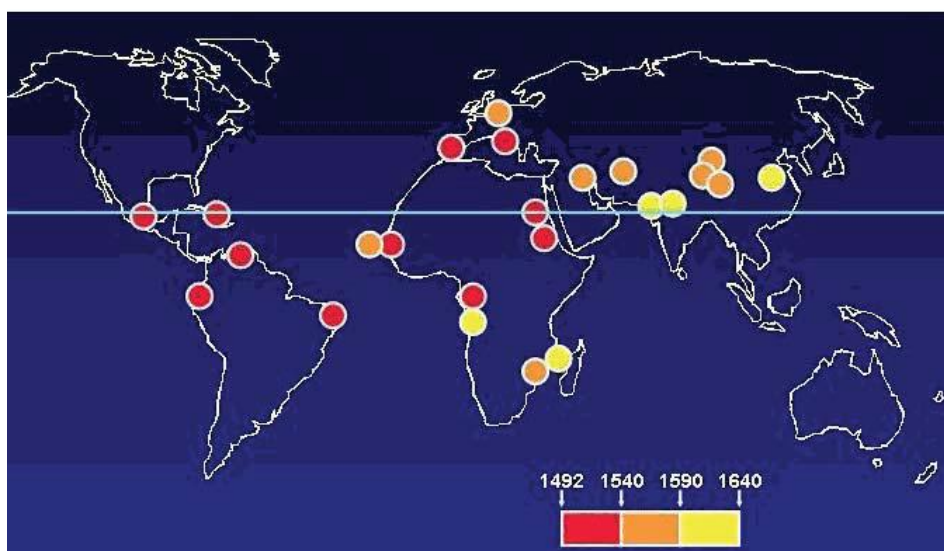


Figura 2: Difusão cronológica do milho (*Zea mays L. ssp. mays*) desde a Meso – América até à Ásia (Desjardins&Mccarthy, 2004)

O milho desenvolve características morfológicas e diferenças entre os estádios vegetativos (fase fisiológica de desenvolvimento da planta) e reprodutivos (fase de reprodução). Alguns genótipos têm se adaptado às especificidades ecológicas, tais como a sensibilidade à temperatura. A morfologia da planta também tem sofrido alterações evolutivas que resultam numa grande variabilidade no comprimento e largura da folha, altura da planta, número de espigas, ciclos de maturação, tipos de

grão, entre outras. Esta variabilidade é de grande valor para a melhoria da produtividade da planta e dos componentes específicos do grão. Os grãos estão dispostos na espiga ou maçaroca, unidos a esta por um apêndice inferior, “tip cap” ou pedúnculo. O grão representa cerca de 42% do peso seco da planta (FAO, 1993), com exclusão das raízes e nele existem partes bem diferenciadas: endosperma e embrião. A distribuição ponderal mais frequente dos seus componentes surge descrita na Tabela 1 e na Figura 3 encontra-se o esquema de um grão de milho.

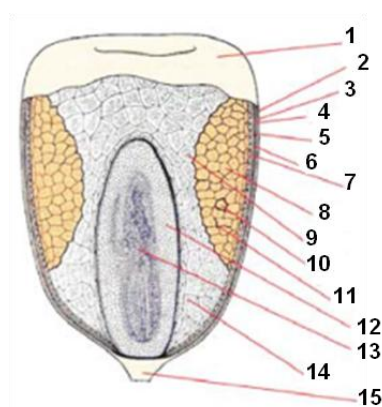


Figura 3: Secção transversal de um grão de milho (Pomeranz (1987); legenda: 1-pericarpo, 2-epiderme, 3-mesocarpo, 4-células transversais, 5-células tubulares, 6-tegumento, 7-aleurona, 8- endosperma vítreo, 9-endosperma farináceo, 10- grânulo de amido na matriz proteica, 11-parede celular, 12-escutelo, 13-embrião, 14- grânulo de amido, 15- “tip cap”

Tabela 1: Distribuição média das partes principais do grão de milho (Tabela adaptada da FAO, 1993:-“Maize in human nutrition”).

Estrutura	Distribuição média (%)
Pericarpo	5-6
Aleurona	2-3
Endosperma	80-85
Embrião	10-12

Os grãos apresentam diferentes cores e são muitas vezes brancos ou de cor amarela, embora o preto, o vermelho também sejam encontrados. Esta diferença de

cores está relacionada com a variedade de compostos químicos armazenados no grão (FAO 1993).

Segundo Watson (1991) consideram-se cinco classes gerais de tipos de milho com base nas características do grão de milho: milho dentado (*dent corn*), milho liso (*flint corn*), milho “pipoca” (*popcorn*), milho farinhento (*flour corn*) e milho doce (*sweet corn*).

As classes dentadas, lisas e farinhentas são as mais utilizadas como alimento. O milho dentado apresenta elevado teor de amido e baixo teor de proteínas (Haros, *et al.*, 2003) e é, comercialmente, o mais importante (73% produção mundial) e o preferido para moagem por via húmida e para alimentação animal. A representar 14% da produção mundial surge o milho liso, que apresenta resistência mecânica ao transporte e silagem e é o mais comum nas variedades tradicionais portuguesas (Watson, 1991). O milho farinhento é ideal para o processamento por moagem seca para obtenção da farinha (Brites, *et al.*, 2007).

O grão de milho, bem como a farinha integral são considerados boas fontes de energia, principalmente pelo seu alto conteúdo em hidratos de carbono, nomeadamente o amido, que constitui cerca de 72-73% do grão, seguindo-se as proteínas com 6-18% da composição do grão (FAO 1993). É também constituído por aminoácidos essenciais, como a lisina e o triptofano, por exemplo, que em comparação com outros alimentos (leite e ovos) estão, no entanto, em menor quantidade (Hogan, *et al.*, 1955). Os lípidos encontram-se no embrião, com valores entre 3 e 18 %. Depois dos hidratos de carbono, proteínas e lípidos, o componente nutricional, quantitativamente, mais importante é a fibra, que se localiza principalmente no pericarpo e é constituída por oligossacarídeos, polissacarídeos e lignina.

O milho apresenta ainda na sua composição química compostos como carotenóides, vitaminas e minerais, cujo teor diminui ao passar de grão a farinha devido ao processo de moagem, uma vez que estes micronutrientes se encontram na camada exterior do grão e no embrião. A maioria dos carotenóides encontram-se no endoesperma vítreo e estão presentes em quantidades variáveis no milho amarelo e praticamente não se encontram no milho branco (Brites, *et al.*, 2007).

Mais de 75% do milho é para fins industriais, a partir da moagem húmida, seca e nixtamalização. A moagem húmida é utilizada para a obtenção de amido, a moagem seca para obtenção de farinhas de milho e sêmolas de diferente granulometria. A nixtamalização é um processo de cozimento e maceração do milho maduro em solução alcalina de cal (CaO), durante 1h a 3h em 1,3% de peso. Este processo facilita a moagem, melhora o sabor, aroma e valor nutritivo, adquirindo a farinha propriedades adequadas para a elaboração de determinados produtos como *tortillas*, por exemplo (Barbieri&Casiraghi, 1983; Brites, *et al.*, 2007).

As farinhas apresentam diferentes classificações: refinada, integral, sêmola e nixmatilizada, que estão relacionadas com o tipo de processo a que são submetidas e com o produto final. A farinha usada neste trabalho é do tipo integral, por isso maior ênfase será dado a este tipo de farinha. De acordo com o *Codex Alimentarius*, farinha integral de milho, destinada ao consumo, é definida como alimento humano direto que é obtido a partir de grãos de milho (*Zea mays L.*) totalmente maduros, saudáveis, não germinados, através de um processo de moagem até um grau adequado de finura (Brites, *et al.*, 2007).

Tanto a farinha integral e refinada bem como a sêmola têm substituído o grão de milho como importantes componentes da dieta em muitos lugares do mundo. A principal vantagem desses produtos em relação a outras farinhas, tais como trigo, centeio e cevada, é a ausência de glúten, tornando-os adequados para pessoas com doença celíaca (Brites, *et al.*, 2008). Apresentam ainda índice glicémico intermediário (78-79) que é recomendado para uma possível relação com a prevenção de doenças tais como obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares e alguns tipos de cancro (Arteaga Llona, 2006).

Por fim, as farinhas detêm um grande número de aplicações numa enorme variedade de alimentos, sobretudo em cereais para o pequeno-almoço, cujo consumo tem sofrido um aumento nos últimos anos (Brites, *et al.*, 2007). São também usadas em muitas receitas tradicionais de cada país. Na Tabela 2 estão descritos os principais produtos produzidos nos diversos países, que são os mais representativos do mercado (Rooney & Serna-Saldivar, 2003).

Tabela 2: Alimentos tradicionais de cada país fabricados com farinha de milho e com subprodutos da moagem seca do milho (Adaptada de Rooney & Serna-Saldivar, 2003)

Alimento	País	Processo
<i>Broa</i>	Portugal	Pão elaborado com farinha de milho misturada com trigo e centeio e outros ingredientes
<i>Brona</i>	Espanha	
<i>Tortillas, tacos, enchiladas</i>	América Central e México	Discos de massa de milho cozidos em água e sal
<i>Arepas</i> e derivados	Venezuela e Colombia	Discos de massa de milho, recheados com carne, queijo, abacate, cenoura, etc.
<i>Atole</i>	América Central e México	Farinha de milho cozida misturada com leite, açúcar e aromas
<i>Mingau</i>	Brasil	Sêmola cozida em água. Produto semelhante ao <i>Atole</i>
<i>Pamonha</i>	Brasil	Massa de milho verde com leite, açúcar ou sal e frutos desidratados.
<i>Hanchi</i>	América do Sul	Pudim de sêmola cozido com açúcar e frutos desidratados
<i>Polenta</i>	América do Sul	Sêmola cozida em água até gelatinização, recheada com salsa, tomate e queijo ou carne
<i>Tostadas, totopos</i>	América Central	Pedaços de tortilla fritos, com textura crocante
<i>Couscous, cuzcuz</i>	Brasil	Massa cozida por vapor, em várias etapas com intervenção de trituração para evitar agregação. Comercializa-se desidratada
<i>Tamales</i>	América Latina	Massa de milho com sal, recheada com ervilhas, carne ou peixe, envolvida numa folha de milho ou plátano e cozida a vapor
<i>Rosquillos, rosquetes, quesadillas</i>	América	Massa de milho feita com gordura, queijo em forma de palitos recheados
<i>Pozol</i>	América Central e México	Bebida fermentada feita com massa de milho e outros ingredientes como o cacau em pó
<i>Chicha morada</i>	Perú, Bolívia	Bebida fermentada feita com farinha de milho roxo
<i>Tesguino</i>	México	Bebida fermentada semelhante à cerveja

1.2 O milho em Portugal e a produção de Broa

O milho chegou a Portugal no século XVI vindo da América e espalhou-se rapidamente por todo o país desde o Sul até às regiões montanhosas do norte. Durante vários séculos sofreu um processo de seleção natural e humana, originando as diferentes variedades tradicionais portuguesas, adaptadas às diferentes condições ambientais de todo o país. No entanto, após a Segunda Guerra Mundial, Portugal foi um dos primeiros países europeus a introduzir híbridos americanos, que inicialmente não foram bem aceites pelos agricultores portugueses devido a algumas contrariedades, como a maturidade tardia do grão (Vaz Pato, *et al.*, 2008), mas dada a recente utilização de mais variedades de milho híbrido, desenvolvido em Portugal, as variedades locais estão em risco de desaparecer (Vaz Pato, *et al.*, 2007).

Os principais híbridos comerciais de milho que têm substituído as OPVs (variedades de polinização cruzada) em todo o mundo, envolvem um número restrito de linhas puras, limitando assim a diversidade genética disponível (Vaz Pato, *et al.*, 2009). De forma a preservar a variabilidade, há a preocupação em manter as variedades tradicionais ainda em cultivo (Vaz Pato, *et al.*, 2007). A maior parte das variedades locais portuguesas (mais de 95%) são brancas do tipo liso, selecionadas ao longo do tempo pelos padrões de qualidade dos agricultores e destinam-se em grande parte à produção de broa, dada à textura e sabor que lhe conferem (Brites, *et al.*, 2007). A broa de milho produzida com variedades tradicionais (em vez de variedades híbridas) é mais suave, mais doce e conserva-se por mais tempo do que a produzida com as variedades híbridas (Brites, *et al.*, 2007).

A broa é um tipo de pão que foi introduzido inicialmente na Galiza e que é hoje muito consumida nas zonas norte e centro de Portugal, sendo preparada por uma grande variedade de receitas com métodos tradicionais de panificação (Brites, *et al.*, 2007) e depende do tipo de milho usado (Vaz Pato, *et al.*, 2007).

O processo mais tradicional para a produção de broa reside na adição de farinha de milho (50 a 80%), água quente, farinha de trigo ou centeio (50 a 20%), e massa “mãe”. A massa mãe é uma porção de massa do dia anterior, onde se

encontram leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e bactérias lácticas, sobretudo *Lactobacillus*.

A flora microbiana tem muitos benefícios sobre a qualidade da broa: pode melhorar a consistência e estabilidade da massa, o volume e textura do pão, a atividade proteolítica das bactérias e promover a libertação de aromas, enquanto que a produção de ácido acético e láctico provoca o declínio do pH, que atrasa o envelhecimento do pão. Após a mistura, a massa fica a fermentar durante 2h e depois é cozida em forno de lenha a cerca de 250°C, durante 40 minutos (Brites, *et al.*, 2010).

A broa (Figura 4 a) comparativamente com outros tipos de pão apresenta menor conteúdo em cinzas, proteínas e lípidos, provavelmente devido à intensa atividade proteolítica e lipolítica que ocorre durante a fermentação por parte da microflora presente (Rocha, *et al.*, 2003).

A broa de Avintes (Figura 4 b) é uma das mais conhecidas, caracterizada por um tom castanho escuro, um sabor intenso e agri-doce e a broa de Valdevez (Figura 4 c) foi incluída em 2006, na lista dos melhores produtos regionais “Arca dos sentidos” pela Organização Mundial “Slow Food” (Brites, *et al.*, 2007).

Os escassos estudos científicos sobre a broa e panificação têm-se referido à substituição parcial de farinha de trigo por farinha de milho ou amido (Miyazaki & Morita, 2005), uma vez que poderá constituir a base para desenvolver um pão sem glúten, baseado somente em farinhas de milho (Brites, *et al.*, 2010). O glúten confere propriedades viscoelásticas à matriz quando esta é mecanicamente misturada com água, contrariamente ao trigo. Assim, um pão de milho não apresenta viscoelasticidade, apresentando um miolo com textura compacta e de baixo volume (Vaz Patto, *et al.*, 2009).



a)



b)



c)

Figura 4: **a)** Aspeto da broa tradicional (Brites, *et al.*, 2007), **b)** Aspeto da broa de Avintes (www.google.com), **c)** Aspeto da broa de Valdevez (www.google.com)

1.3 O projeto SOLIBAM e as amostras de milho em estudo

O projeto SOLIBAM tem como objetivo o desenvolvimento de abordagens inovadoras que integrem o melhoramento de plantas e técnicas culturais. Estas abordagens permitirão o aumento da produção, qualidade, sustentabilidade e estabilidade das culturas adaptadas aos sistemas de agricultura biológica quer na Europa quer na África Subsariana. Pretende conceber, desenvolver e testar sistemas de produção inovadores baseados em elevados níveis de agrobiodiversidade, com vista à otimização da produção na agricultura biológica, assim como à avaliação qualitativa e quantitativa em termos nutricionais e organoléticos; atendendo à apreciação do utilizador final dos diversos cereais (trigo mole e duro, cevada e milho). O milho em estudo neste trabalho, futuramente, será testado em diferentes condições

agroecológicas e de produção para estabelecer modelos aplicáveis aos diferentes climas.



Figura 5: Grãos de diferentes variedades de milho correspondentes a amostras analisadas

As amostras (Figura 5) em estudo neste trabalho são populações de variedades tradicionais/regionais, de polinização cruzada.

1.4 Compostos voláteis do milho

O aroma é certamente um dos parâmetros mais importantes, determinantes da qualidade dos alimentos e da aceitação por parte do consumidor. Resulta da presença nas amostras de compostos voláteis que apresentam baixo peso molecular. Estes compostos podem ser provenientes da matéria-prima ou podem ser formados durante o processo de produção ou armazenamento (Morales, *et al.*, 2001; Callejón, *et al.*, 2009).

As características de um alimento também dependem do *flavor* ou *flavour*, impressão sensorial causada pela sensação olfativa, gustativa e trigeminal (Smitha, *et al.*, 2005).

Existem muitos trabalhos publicados referentes ao milho, mas só alguns se centram no estudo de compostos voláteis. Degenhardt & Gershenzon, 2000; Schnee, *et al.*, 2002, Köllner, *et al.*, 2004, estudaram a formação e função de terpenos no milho, tendo concluído que os sesquiterpenos individuais variam, amplamente, em abundância entre os diferentes órgãos e fases de desenvolvimento do milho.

Detetaram a presença de (E) - farneseno e bergamoteno (nas folhas e casca), copaeno, D- germacreno e cadineno (cascas de plantas maduras), bisaboleno e um sesquiterpeno desconhecido (nas raízes). As plantas em geral apresentam um grande número de terpenos estruturalmente diversos e o milho não é exceção. A toxicidade destes para muitos herbívoros, insectos e micróbios, implica-os na defesa directa das plantas, sendo atraídos pelo aroma de compostos como os terpenos.

Com vista ao estudo de condições mais eficazes para retardar a deterioração sensorial durante o processamento de flocos de milho, Paradiso, *et al.*, (2009) compararam diferentes antioxidantes naturais e estudaram a relação entre as propriedades sensoriais do produto e o padrão de voláteis de oxidação. Trinta e quatro compostos voláteis foram encontrados nos flocos que se encontravam armazenados há um ano e verificou-se que dos seis alcoóis, o 1-pentanol e o 1-octen-3-ol que inicialmente eram os mais abundantes, o seu teor diminuiu nos flocos tratados com antioxidantes. De dez aldeídos, o principal - o hexanal – foi o único que não foi afetado pela adição de antioxidantes, sendo os restantes afetados. Utilizando a técnica de SPME-GC/MS foi então possível identificar os compostos voláteis que causam variações significativas no perfil sensorial do produto e que são principalmente ácidos, lactonas, n- alcanóis e 2-alquenais (E).

Existe alguma bibliografia sobre a contribuição de alguns compostos para as características sensoriais dos flocos de milho. Assim, os ácidos orgânicos estão relacionados com *off-flavours*, como o cheiro a ranço, gordura, azedo, forte e a queijo (Guth & Grosch, 1993; Krist, *et al.*, 2006; Mahajan, *et al.*, 2004; Paradiso, *et al.*, 2009; Takahashi, *et al.*, 2004; Triqui & Guth, 2001). Os 2-alquenais são responsáveis por odores descritos como plástico, amargo, rançoso e penetrante (Reiners & Grosch, 1998; Jacobsen, *et al.*, 1999; Neff, *et al.*, 2000; Krist, *et al.*, 2006). O nonanal está associado com o cheiro a cera e a tinta (Fenaille, *et al.*, 2003), o heptanal como pungente e penetrante (Heiniö, *et al.*, 2003; Krist, *et al.*, 2006), octanal como gorduroso (Krist, *et al.*, 2006) e os n- alcanos como pungentes. O 1-octen-3-ol é um dos compostos responsáveis pelo odor a ranço e o 2, 4 – nonadienal produz sensações

pungentes e rançosas (Högnadóttir & Rouseff, 2003; Valim, *et al.*, 2003; Mahajan, *et al.*, 2004).

Bredie, *et al.*, (1998) estudaram os compostos voláteis presentes em farinha de milho aquando do processo de extrusão. O *flavour* gerado durante o processo de extrusão envolve reações termicamente induzidas, como a reação de Maillard, a degradação de lípidos e vitaminas, resultando compostos como 2,4 (E,E)-decadienal, 2,4 (E,E)-nonadienal e (E)-4,5-epoxy-2 (E)-decenal, bem como a vanilina, que contribuem para um aroma doce, gorduroso e a frito (Guth. & Grosch, 1993). Identificou 80 compostos na farinha de milho resultante do processo de extrusão¹. Estes incluíam 20 compostos contendo enxofre (ex: dimetil disulfido), 16 pirazinas (ex: metilpirazina), 12 aldeídos (ex: pentanal, hexanal, 2-heptenal (E), octanal, nonanal), 11 pirróis (ex: 2-acetil-1-pirrolina), 5 álcoois (ex: 1-hexanol, 1-nonanol), 5 furanos (ex: 2-furfural, 2-acetilfurano), 4 cetonas (ex: 2-heptanona, geranil acetona) e 4 hidrocarbonetos (ex: tolueno, octano). Entre os aldeídos, cetonas e álcoois identificados no extrato, alguns podem ser classificados como produtos de degradação. Contudo a origem da maioria dos aldeídos alifáticos e álcoois, bem como os hidrocarbonetos alifáticos e 2-pentilfurano, são resultantes da degradação oxidativa e/ou térmica dos lípidos insaturados (Grosch, 1982). Muitos destes compostos referidos também foram encontrados como compostos voláteis das pipocas (Buttery, *et al.*, 1997; Park & Maga, 2006).

Os aldeídos e os álcoois surgem como os compostos maioritariamente identificados em cereais como a aveia (visto não existir informação referente ao milho), na qual o hexanal é descrito como o composto volátil mais abundante (Klensporf & Jelén, 2005).

¹ Processo mecânico que converte um material sólido em fluído pela aplicação de calor. Promove a gelatinização do amido, desnaturação e a re-orientação das proteínas, a inativação enzimática, a destruição de algumas substâncias tóxicas e diminuição de contaminação microbiana (Sebio, 1996)

1.4.1 Análise de compostos voláteis

Quando se procede à análise de uma amostra os processos de amostragem e de preparação de amostra são muito importantes pois podem condicionar os resultados obtidos. No caso de uma amostra líquida, esta é introduzida num cromatógrafo gasoso e os seus componentes voláteis são vaporizados e arrastados através da coluna, pelo gás de arraste (fase móvel) (Ettre, 2002). Em amostras sólidas é mais complicado, uma vez que este tipo de amostra não pode ser introduzido diretamente no equipamento e exige um procedimento de extração prévio (Ettre, 2002; Akapo, *et al.*, 2008; Majcher, *et al.*, 2009). De entre as técnicas de extração normalmente usadas destacam-se a extração líquido-líquido (LLE), a extração com fluído supercrítico (SFE), a extração em fase sólida (SPE) e a micro extração em fase sólida (SPME) (Barrionuevo & Lanças, 2000; Akapo, *et al.*, 2008; Majcher, *et al.*, 2009).

A cromatografia gasosa acoplada a um espectrómetro de massa (GC/MS) é amplamente utilizada na separação e quantificação de compostos voláteis (Buttery, *et al.*, 1997; Bredie, *et al.*, 1998; Ettre, 2002; Park & Maga, 2006; Kaseleht, *et al.*, 2010). Combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espetrometria de massa (obtenção de informação estrutural, massa molar e maior seletividade) (Vékey, 2001). Paradiso, *et al.*, (2009) recorreram à extração dos compostos voláteis de cereais de pequeno-almoço por SPME e à sua análise por GC/MS. Os voláteis foram extraídos por SPME com uma fibra do tipo divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS).

Com vista à análise de compostos voláteis em alimentos, a micro-extração em fase sólida (SPME) tornou-se uma técnica popular (Harmon., 2001; Wampler, 2001; Ruiz, *et al.*, 2003; Pinho, *et al.*, 2006). Alguns estudos referentes à análise de compostos voláteis em cereais, utilizando a técnica de SPME, foram recentemente publicados (Sides, *et al.*, 2001; Klensporf & Jelén, 2008). A popularidade atual da SPME prende-se com o fato de: (i) ser uma técnica rápida (toda a operação é reduzida a duas etapas simples, de extração e dessorção), (ii) não usa solventes, (iii) permite a extração de compostos voláteis do “headspace” e (iv) existe disponibilidade de diferentes revestimentos para a fibra, adequados para a polaridade do composto de interess

(Kaseleht, *et al.*, 2010). Apresenta as mesmas vantagens da SPE, tais como simplicidade, baixo custo, fácil manuseamento e ao mesmo tempo elimina desvantagens da SPE, como a colmatção de cartuchos e o uso de solventes orgânicos (Barrionuevo & Lanças, 2001).

A maior desvantagem da técnica de SPME é o custo das fibras e a dependência de condições operacionais como temperatura e tempo de extração (Arthur, *et al.*, 1992; Yang & Peppard, 1994; Dórea, *et al.*, 2008; Akapo, *et al.*, 2008; Majcher, *et al.*, 2009).

A operação de extração em SPME pode ser feita no modo direto ou de *headspace*. Para extrações diretas, a fibra é imersa em amostras líquidas (aquosa) ou gasosas. Já no segundo caso, mais adequado para extração de analitos de volatilidade moderada a alta e para amostras sólidas, suspensões ou materiais de origem biológica, a fibra é exposta ao *headspace* da amostra. Independentemente do modo operacional, as espécies químicas presentes na amostra são retidas pela fibra até ser atingido o equilíbrio de partição entre as fases, quando idealmente a concentração das espécies sorvidas pela fibra é proporcional à sua concentração original na amostra (Pires Valente & Augusto, 2000; Barrionuevo & Lanças, 2001; Ettre, 2002; Mata, *et al.*, 2003; Dórea, *et al.*, 2008). Terminado o tempo de extração, a fibra é retraída para o interior da agulha hipodérmica e levada para inserção no injetor de um cromatografo de fase gasosa aquecido a temperatura elevada. Os analitos são dessorvidos pelo efeito da temperatura elevada e são arrastados através coluna onde ocorre a sua separação e posteriormente a sua deteção.

A sequência de procedimentos para realizar a extração e a dessorção no injetor do cromatógrafo é apresentada na Figura 6.

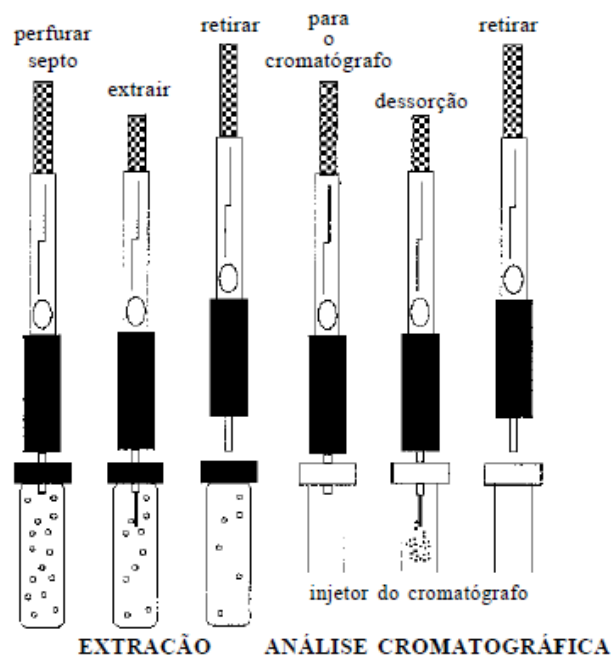


Figura 6: Uso do dispositivo de SPME para a análise de compostos voláteis processo por GC
(adaptada de Valente & Augusto, 1999)

A otimização do procedimento para SPME, nomeadamente o tempo e temperatura de extração, para além da escolha do tipo de revestimento da fibra, é um passo importante para alcançar as condições adequadas para a análise de compostos voláteis e sensibilidade analítica suficiente em toda a gama de compostos (Kataoka, 2000; Kaseleht, *et al.*, 2010). A fibra de DVB/CAR/PDMS surge descrita, maioritariamente, para a análise de compostos voláteis, devido à sua polaridade mista (Kataoka, *et al.*, 2000; Klensporf & Jelén, 2005).

1.5 Compostos fenólicos do milho

A presença de compostos fenólicos em fontes de origem vegetal tem sido amplamente explorada nas últimas décadas. Além do seu potencial funcional, decorrente de compostos antioxidantes presentes, a perspectiva de atuarem como conservantes naturais também tem estimulado o interesse da comunidade científica (Hassimotto, *et al.*, 2005; Shahid, *et al.*, 2007; Broinizi, *et al.*, 2007; Oliveira & Badiale-Furlong, 2008).

“Composto fenólico” é um termo genérico que se refere a mais de 8000 compostos amplamente dispersos por todo o reino vegetal (Cartea, *et al.*, 2011), muitos dos quais ocorrem naturalmente em plantas alimentícias (Ferguson, 2001). São um amplo grupo de compostos fitoquímicos derivados da fenilalanina e tirosina e de considerável importância fisiológica e morfológica nas plantas (Balasundram, *et al.*, 2006; Angelo & Jorge, 2007). Desempenham um papel essencial no crescimento e reprodução da planta, além de que fornecem proteção contra agentes patogênicos, radiações UV e contribuem para as características sensoriais e cor da planta, entre outras (Jaganath & Crozier, 2010; Cartea, *et al.*, 2011; Zikta, *et al.*, 2011).

Estes compostos possuem um anel aromático que apresenta um ou mais grupos hidroxilo e as suas estruturas vão desde uma molécula simples a um polímero de alta complexidade molecular, que se podem encontrar na forma livre nos vegetais ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (Balasundram, *et al.*, 2006). Apesar da grande diversidade estrutural existente, podem ser classificados em várias classes consoante o número de anéis aromáticos (Naczki & Shahidi, 2006; Balasundram, *et al.*, 2006; D'Archivo, *et al.*, 2007; Angelo & Jorge, 2007). As várias classes surgem categorizadas na Tabela 3. Destacam-se os flavonóides e os ácidos fenólicos como os mais comuns antioxidantes de fonte natural (Balasundram, *et al.*, 2006; Angelo & Jorge, 2007).

Tabela 3: Classes de compostos fenólicos presentes em plantas (Adaptada de Balasundram, *et al.*, 2006; Angelo & Jorge, 2007)

Classe		Estrutura
Fenóis simples, benzoquinonas		C_6
Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxibenzóicos	$C_6 - C_1$
	Ácidos hidroxicinâmicos	$C_6 - C_3$
Naftoquinonas		$C_6 - C_4$
Xantonas		$C_6 - C_1 - C_6$
EStilbenos, antoquinonas		$C_6 - C_2 - C_6$
Flavonóides, isoflavonóides		$C_6 - C_3 - C_6$
Lignanas, neolignanas		$(C_6 - C_4)_2$
Biflavonóides		$(C_6 - C_3 - C_6)_2$
Ligninas		$(C_6 - C_3)_n$
Taninos condensados		$(C_6 - C_4 - C_6)_n$

Atendo à diversidade de classes existentes, serão focadas apenas 2 destas, por serem as estudadas ao longo deste trabalho: ácidos fenólicos e flavonóides.

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupo carboxilo e um ou mais grupos hidroxilo e/ou metoxilo na molécula. Estão divididos em 2 subgrupos: derivados do ácido hidroxibenzóico (Figura 7 a) e derivados do ácido cinâmico (Figura 7 b). Compostos como o ácido gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatechuico, vanílico e sirínico fazem parte dos ácidos hidroxibenzóicos, enquanto que compostos como o ácido cafeíco, ferúlico, *p*-cumárico e sinápico são exemplos de ácidos hidroxicinâmicos (Balasundram, *et al.*, 2006; Angelo & Jorge, 2007). Os ácidos hidroxicinâmicos possuem maior atividade antioxidante (AA), comparativamente aos ácidos benzóicos e pode dizer-se que são os compostos que mais contribuem para a atividade antioxidante nas plantas, bem como no milho (Andreasen, *et al.*, 2001; Balasundram, *et al.*, 2006; Angelo & Jorge, 2007). Este fato deve-se à presença de uma dupla ligação no radical presente na molécula dos derivados do ácido hidroxicinâmico, que contribui para a estabilidade da molécula por

ressonância do eletrão desemparelhado, enquanto que os derivados do ácido benzóico não apresentam essa característica (Angelo & Jorge, 2007).

A atividade antioxidante dos ácidos hidroxicinâmicos também é maior quando a molécula apresenta grupos metoxilo na sua estrutura. A presença de um grupo metoxilo adjacente ao hidroxilo, como ocorre no ácido ferúlico, atrasa a ocorrência de oxidações. Este tempo é ainda maior na presença de dois grupos metoxilos, como ocorre no ácido sinápico. Moléculas que apresentem dois grupos hidroxilo nas posições 3 e 4 - estrutura apresentada pelos ácidos cafeico e 3,4-dihidroxibenzóico, apresentam um maior potencial antioxidante (Marinova & Yanishlieva, 1992).

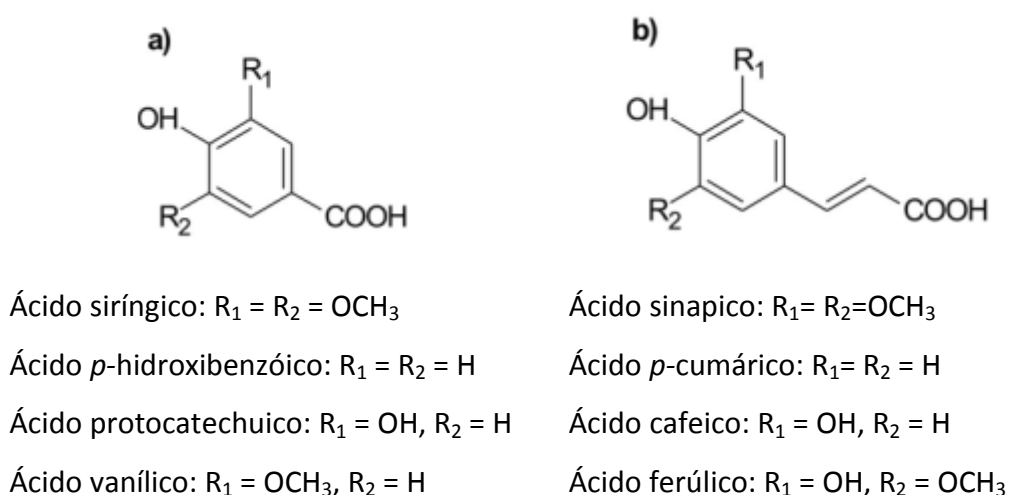
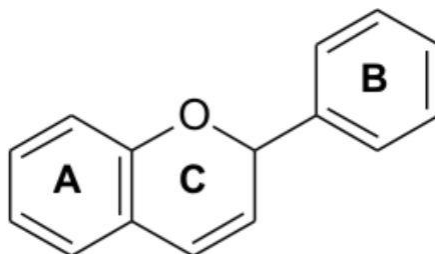


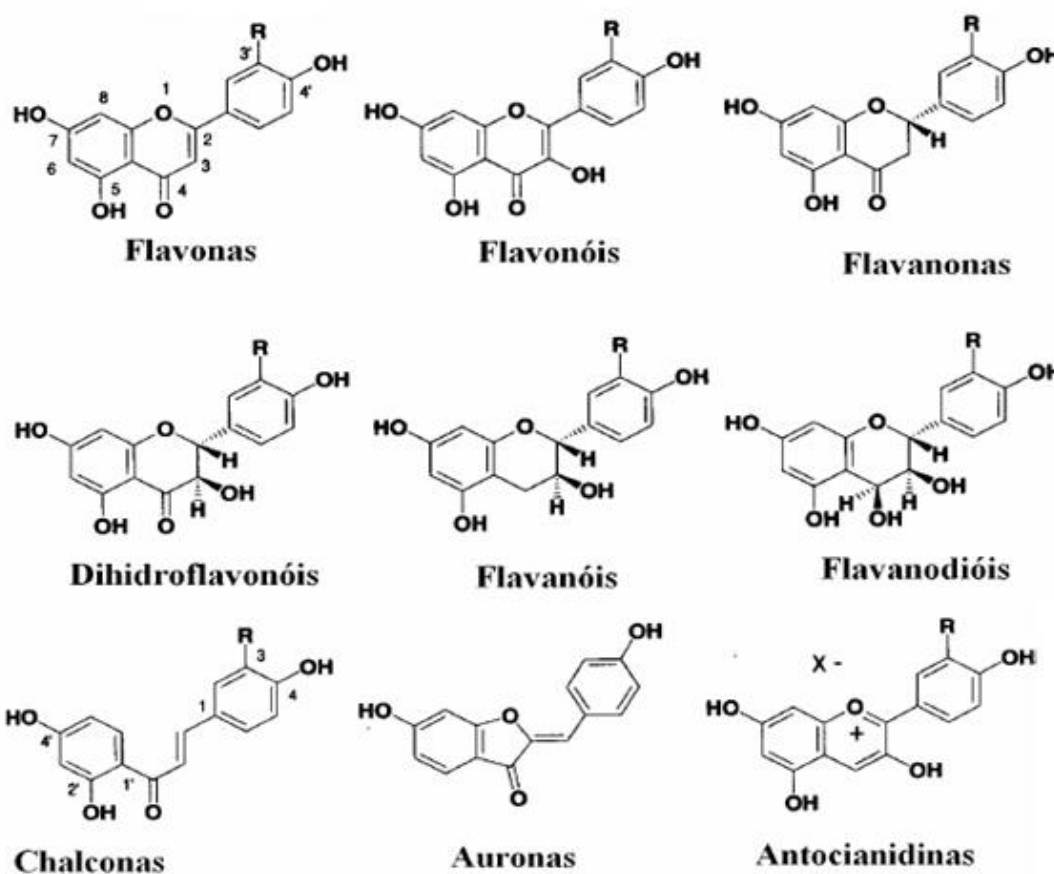
Figura 7: Estrutura química de ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b)

Por sua vez, os flavonóides, constituem o maior grupo de compostos fenólicos (Liu, *et al.*, 2011), são compostos com baixo peso molecular que se encontram presentes em frutas, folhas e sementes e em outras parte da planta na forma de glicosídeos ou agliconas (Heim, *et al.*, 2002; Angelo & Jorge, 2007). A estrutura química dos flavonóides (Figura 8) consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por uma ponte de carbono, geralmente sob a forma de anel heterocíclico – anel C (Heim, *et al.*, 2002; Balasundram, *et al.*, 2006; Angelo & Jorge, 2007). Diferentes substituições no anel C originam diferentes classes de flavonóides, como se pode

verificar na Figura 8 b) e substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonóides. Estas substituições podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação.



a)



b)

Figura 8: a) Estrutura química dos flavonóides (Adaptada de Heim, *et al.*, 2002); b) estrutura das diferentes classes de flavonóides

Os efeitos terapêuticos de muitos medicamentos à base de produtos naturais são atribuídos à presença de flavonóides, devido à sua ampla atividade farmacológica e principalmente à sua atividade antioxidante. Em virtude da sua capacidade de inibir a oxidação dos LDL, uma das propriedades mais referenciadas para os flavonóides tem sido o seu efeito cardioprotetor (Heim, *et al.*, 2002).

Nos alimentos, os compostos fenólicos são os responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa. As principais fontes alimentares destes compostos são as frutas, os legumes, os cereais, o chocolate e bebidas como o café, o chá e o vinho (Balasundram, *et al.*, 2006; D'Archivio, *et al.*, 2007).

O consumo de alimentos contendo uma quantidade significativa destes compostos, está cada vez mais associado a benefícios para a saúde, devido em grande parte à sua atividade antioxidante (Balasundram, *et al.*, 2006). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos ocorre devido à sua capacidade de capturar radicais livres e doar átomos de hidrogénio ou eletrões e agem de várias maneiras, incluindo complexação com iões metálicos e decomposição de peróxidos. Muitas vezes, estão envolvidos vários mecanismos e mecanismos sinérgicos (Oliveira, *et al.*, 2009).

Para avaliar a atividade antioxidante os ensaios mais utilizados, incluem o teste do DPPH (Feet & Troncoso, 2004), que é um dos métodos mais indiretos e antigos para determinação da atividade antioxidante. Mais tarde foi quantificado para determinar o potencial antioxidante de compostos fenólicos isolados e de alimentos, bem como de amostras biologicamente relevantes (Roginsky & Lissi, 2005). Os métodos de ORAC e HORAC são métodos mais específicos e também utilizados para determinar a atividade antioxidante, sendo que o primeiro é utilizado para avaliar a capacidade antioxidante das amostras em relação ao radical peroxilo. Este método mede a capacidade das espécies antioxidantes, presentes na amostra, de inibir a oxidação da FL (Fluoresceína) catalizada pela AAPH (2', 2'-Azobis (2-amidinopropano) dicloridrato), gerando radicais peroxilo (ROO^{\bullet}). Por sua vez, o método de HORAC mede a capacidade da amostra para inibir a formação de radicais hidroxilo (Serra, *et al.*, 2010).

Os compostos fenólicos possuem outras propriedades biológicas para além das propriedades antioxidantes e na Figura 9 apresentam-se alguns compostos com

diferentes atividades, tais como antialérgicas (ácido rosmarínico e curcumina), anti-inflamatórias (catequina e resveratrol), anti-microbianas (ácido aminobenzóico e *p*-cumárico), anti-mutagénicas (ácido caféico, quercetina e taxifolina), entre outras.

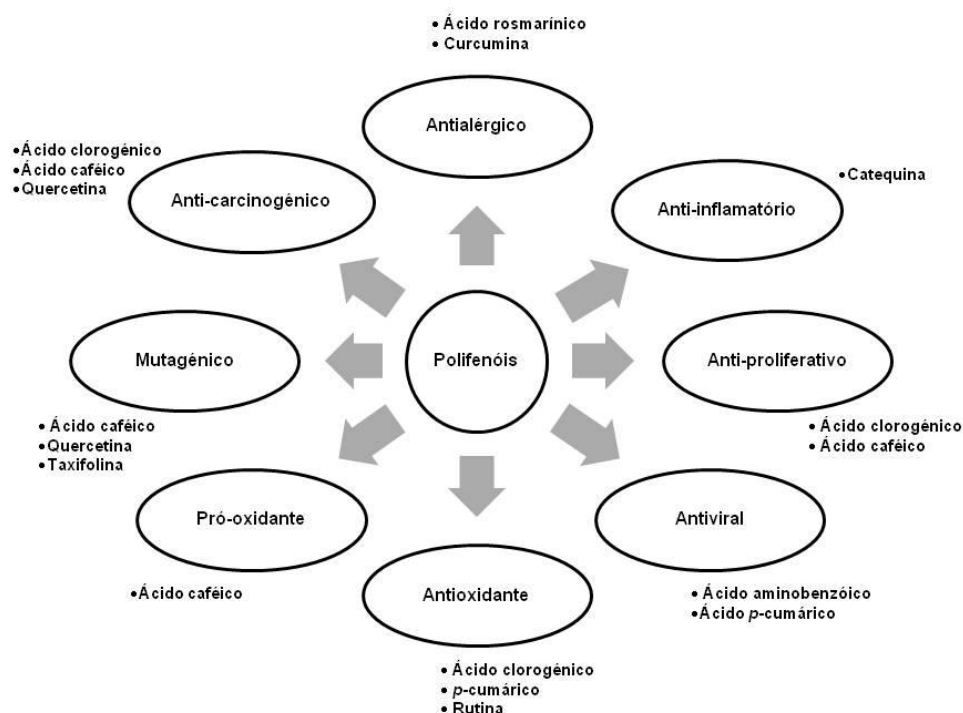


Figura 9:Propriedades biológicas dos compostos fenólicos (Adaptada de Zikta, *et al.*, 2011)

Muitos estudos têm demonstrado uma boa correlação entre o teor de fenóis totais e atividade antioxidante (Javanmardi, *et al.*, 2003; Huang, *et al.*, 2005; Silva, *et al.*, 2006).

Os ácidos fenólicos e flavonóides estão presentes nos cereais em formas livres e conjugadas. A grande diversidade estrutural dos compostos motivou uma classificação em compostos fenólicos solúveis e insolúveis (Mira, *et al.*, 2008). Os compostos solúveis encontram-se compartimentados em vacúolos celulares (Beckman, 2000) e estão na forma livre ou conjugada, enquanto que os insolúveis encontram-se ligados a estruturas de parede celular, esterificados com arabinose ou resíduos de galactose dos componentes pécticos ou hemicelulósicos (Faulds&Williamson, 1999). Os ácidos fenólicos livres representam a menor parte dos compostos fenólicos e são solúveis em soluções aquosas-orgânicas, tais como metanol, etanol ou acetona (Tian, *et al.*, 2004). Os compostos fenólicos conjugados estão frequentemente sob a forma

de ésteres e amidas, raramente aparecem como glicosídeos. Eles incluem compostos com baixo peso molecular, solúveis em água, presentes no citosol, ou formas lipossolúveis, associadas às ceras da superfície da planta (Karakaya, 2004).

Adom & Liu (2002) descreveram que os compostos fenólicos ligados contribuem com uma porção importante para os fenólicos totais em grãos, embora os seus teores pareçam ser subestimados em grãos como milho, aveia, trigo e arroz devido aos métodos serem inadequados para a sua extração. Logo a sua contribuição para a atividade antioxidante e biológica parece estar subestimada (Goffman & Bergman, 2004; Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2005; Kim, *et al.*, 2006). Assim, com vista à extração de compostos fenólicos conjugados, a extração por hidrólise alcalina tem sido recomendada (Mira, *et al.*, 2008).

Em várias espécies de milho (*Zea mays L. ssp. Mays, Poaceae*) foram determinados compostos fenólicos como antocianinas, ácido *p*-cumárico, vanílico, protocatechuico e ácido ferúlico (Balasundram, *et al.*, 2006). Os últimos três compostos foram encontrados no milho amarelo em baixos teores (Lopez Martinez, *et al.*, 2009). Vários estudos têm relatado capacidade antioxidante e anticarcinogénica no milho branco, que é atribuída à presença do ácido ferúlico (Del Pozo, *et al.*, 2006). Lopez- Martinez, *et al.*, (2009) realizaram um estudo em que relacionaram os teores de compostos fenólicos (antocianinas e ácido ferúlico) com a atividade antioxidante de 18 diferentes fenótipos de milho mexicano, tendo concluído que havia uma relação, sendo que os fenótipos mais ricos em compostos fenólicos eram variedades de milho roxo. As antocianinas analisadas por HPLC-DAD em espigas de milho roxo e sementes incluem a cianidina-3-glucósido, a pelargonidina -3-glucósido e a peonidina-3-glucósido. O milho também é uma fonte de flavonóides antioxidantes como isoramnetina, canferol e quercetina (Mohsen & Ammar, 2009).

1.5.1 Análise de compostos fenólicos

Muitos investigadores têm efetuado trabalhos que visam a extração, separação, identificação e quantificação dos compostos fenólicos em alimentos. A análise é complexa devido à enorme gama de substâncias, que muitas vezes são reativas e existem em concentrações diversas. Os métodos usados podem ser classificados em métodos para quantificação de compostos fenólicos totais, quantificação individual de um composto e ou de classes de compostos fenólicos, neste caso, o método de flavonóides totais, por exemplo (Moure, *et al.*, 2001).

A análise de compostos fenólicos depende da natureza do composto, método de extração, tamanho da amostra e a presença de interferentes como gorduras, terpenos e clorofilas. A solubilidade dos compostos fenólicos varia de acordo com a polaridade do solvente utilizado, o grau de polimerização dos compostos fenólicos, as suas interações com outros constituintes dos alimentos e a formação de complexos insolúveis. Assim, fatores como composição do solvente, tempo e temperatura de extração, relação solvente: amostra, tratamento da amostra, entre outros têm influência significativa na eficácia de extração, refletindo-se na maior ou menor recuperação desses compostos. Os solventes mais utilizados para a extração destes compostos são metanol, etanol, acetona, água, acetato de etilo, propanol, dimetilformaldeído e combinações destes, dadas as suas características de polaridade e solubilidade (Naczek & Shahidi, 2004).

Mohsen & Ammar, (2009) realizaram um estudo com o objetivo de testar diferentes solventes para extração dos compostos fenólicos do milho (etanol, acetona, água, metanol, hexano, clorofórmio, butanol, éter de petróleo e cloreto de metileno), de forma a determinar a sua capacidade antioxidante. Concluíram que o etanol era o melhor solvente para a extração dos compostos fenólicos do milho.

Outros autores, Lopez Martinez, *et al.*, (2009) realizaram um estudo semelhante com o objetivo de determinar os níveis de antocianinas e ácido ferúlico e a atividade antioxidante de 18 fenótipos diferentes de milho mexicano e para isso seguiram diferentes procedimentos consoante o objetivo da análise: extração de compostos fenólicos livres, extração de compostos fenólicos conjugados, extração do ácido ferúlico e determinação dos compostos fenólicos totais segundo um procedimento adaptado de Swain & Hillis (1959) e modificado por Gao, *et al.*, 2002, usando o reagente de Folin-Ciocalteu e por fim a determinação do conteúdo de antocianinas. Concluíram que a atividade antioxidante está relacionada com o teor de antocianinas e que o ácido ferúlico se encontra maioritariamente na forma conjugada no grão de milho, no qual se encontra em maior teor comparativamente ao arroz , trigo e aveia.

Vários métodos espectrofotométricos têm sido desenvolvidos para a quantificação de compostos fenólicos em alimentos (Angelo & Jorge, 2007). A técnica de Folin é a mais utilizada (Naczki & Shahidi, 2004). A técnica de Folin-Denis descrita por Swain & Hillis (1959) baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelos grupos hidroxilo dos fenóis, produzindo um complexo de coloração azul que absorve entre 725nm. A reação ocorre em meio alcalino em que se utiliza uma solução saturada de carbonato de sódio. Esta técnica no entanto não é uma técnica específica, pois determina todos os compostos fenólicos presentes, além de substâncias redutoras adicionadas aos alimentos ou naturalmente presentes que podem interferir com os resultados (Angelo & Jorge, 2007) e ainda proteínas e reduz substâncias como o ácido ascórbico (Naczki & Shahidi, 2004). Muitas vezes o reagente de Folin-Denis é substituído pelo reagente de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). Este é mais sensível à redução pelos fenóis e diminui a tendência à precipitação.

A cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a um detetor de díodos (HPLC-DAD), com uma coluna de fase reversa C18, é uma das técnicas amplamente utilizadas na separação e quantificação de compostos fenólicos (Escarpa & Gonzales, 2000; Naczki & Shahidi, 2004; Pedreschi & Cisneros-Zevallos, 2007), devido à sua precisão, versatilidade e relativamente baixo custo (Parejo *et al.*, 2004). O detetor de díodos (DAD) é uma ferramenta importante para a identificação destes compostos,

dado que, a comparação dos seus espectros de absorção dos compostos permite a identificação do tipo de família a que pertencem (Escarpa & Gonzales, 2000).

O estudo de antocianinas presentes nos extratos de *Andrean purple* (milho roxo) e a identificação e quantificação de outros compostos fenólicos, como o ácido protocatechuico, vanílico, *p*-cumárico, quercetina e derivados da hesperidina e do ácido hidroxicinâmico, usando HPLC-DAD como ferramenta analítica foi também efetuado por Pedreschi & Cisneros - Zevallos, 2007.

O alto desempenho da técnica cromatográfica em combinação com a espectrometria de massa tem sido muito utilizada para a identificação estrutural de compostos e para a sua quantificação, nomeadamente em amostras de alimentos como ameixas, pêssegos, nectarinas, cacau, azeite entre outros (Angelo & Jorge, 2007).

A espectrometria de massa (MS) é actualmente uma das técnicas de análise mais utilizadas devido à sua elevada sensibilidade, rapidez e capacidade de fornecer informação que permite identificar a natureza química dos compostos, mesmo em amostras complexas, quando comparada com os métodos convencionais de deteção. A técnica permite adquirir informação estrutural e do peso molecular a partir de quantidades de analito na ordem dos picogramas e permite a monitorização de iões ou fragmentação de iões caraterísticos de um analito de interesse – elevada seletividade (Queiroz, 2001). Esta técnica é cada vez mais utilizada, nos dias de hoje, na análise de produtos naturais, incluindo alimentos.

Na pesquisa efetuada tendo em vista a análise de compostos fenólicos em milho utilizando espectrometria de massa, só foram encontrados dados para a farinha de trigo (Arranz & Calixto, 2010). Esta metodologia neste trabalho utilizou-se para uma caraterização inicial de algumas amostras escolhidas entre o elevado número de amostras em estudo neste trabalho.

2 Objetivos do trabalho

Este trabalho teve como principais objetivos a implementação de metodologias de análise para o estudo da composição volátil e de compostos fenólicos de diferentes variedades tradicionais de milho usadas na produção de “broa de milho” e encontra-se inserido no âmbito do seguinte projeto: SOLIBAM, “Strategies for Organic and Low-input Integrated Breeding and Management” (FP7-KBBE-2009-3, Grant Agreement Nº 245058).

Assim, pretendeu-se otimizar as metodologias para análise de compostos voláteis, que possam contribuir para as características organolépticas (*flavour* e aroma) da broa de milho, bem como as metodologias usadas na análise de compostos fenólicos, de forma a identificar e quantificar compostos que possam contribuir para efeitos biológicos importantes, resultantes do consumo destes produtos. Posteriormente procedeu-se à análise deste tipo de compostos em 51 amostras.

O trabalho foi desenvolvido da seguinte forma:

1. Otimização dos processos para extração de compostos voláteis e fenólicos nas amostras de milho;
2. Implementação de metodologias para análise de compostos voláteis por cromatografia gasosa com detetor de espectrometria de massa (GC/MS);
3. Implementação de metodologias para análise dos teores totais de compostos fenólicos e flavonóides bem como a análise cromatográfica (HPLC-DAD-ED) acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS/MS) com vista à identificação e quantificação dos compostos nas diferentes amostras;
4. Determinação da atividade antioxidante pelos métodos de ORAC e HORAC;
5. Análise de diferentes amostras de farinha de milho.

CAPÍTULO II

3 Parte Experimental

3.1 Amostras em estudo e sua preparação

Para os ensaios de otimização foi utilizada uma amostra de farinha de milho, de uma marca comercial do tipo 70.

As amostras de farinha de milho em estudo neste trabalho, encontram-se descritas na Tabela 4 e apesar da sua proveniência original as plantas foram todas multiplicadas em condições controladas no Verão de 2005, na ESAC. Na tabela as amostras estão identificadas pelo seu genótipo, pela sua cor que foi observada visualmente e pela sua proveniência. A proveniência refere-se à zona do país de origem e algumas amostras correspondem a variedades que foram estudadas e melhoradas num projeto anterior, denominado por “VASO”.

Tabela 4: Identificação das amostras analisadas no âmbito do projeto SOLIBAM

Nº Amostra	Genótipo	Cor	Proveniência
1	ACC Nº03974 94	Amarelo	Alvão
2	Broa-172	Branco	Oliveira do Hospital, Quinta do Lã Branca
3	Broa-21-A	Branco	Vila Nova de Paiva, Póvoa
4	Broa-142	Branco	Gouveia, Casais do Folgosinho (Feiteira)
5	ACC Nº 03972 94	Branco	Alvão
6	Broa-209	Amarelo	Mangualde, Pedreles, Cabeças
7	CMSPH8	Branco	Região centro
8	Broa-34	Amarelo	Vila Nova de Paiva, Pendilhe
9	Broa-83	Branco	Vouzela, Sacorelhe
10	Broa-65	Branco	Castro Daire, Moura Morta
11	Broa-92	Branco	Viseu, Boa Aldeia
12	Amiudo COS084	Amarelo	VASO
13	Broa-214	Branco	São Pedro do Sul, Aldeia de Manhouce
14	CMSPH6	Branco	Região centro
15	Broa-57	Branco	Castro Daire, Midões
16	Broa-186	Branco	Oliveira do Hospital, Ervedal da Beira
17	Broa-136	Branco	Seia, Loriga
18	Broa-148	Amarelo	Gouveia, São Paio de Gouveia
19	Broa-113	Amarelo	Aguar da Beira, Cavada
20	Broa-102	Amarelo	Viseu, Casal de Vil de Soito
21	Bulk 1990/91	Branco	-
22	Broa-48	Amarelo	Castro Daire, Casal de Mamouros

Tabela 4 (continuação): Identificação das amostras analisadas no âmbito do projeto SOLIBAM

Nº Amostra	Genótipo	Cor	Proveniência
23	Aljezudo2006	Amarelo	VASO
24	CMSPH3	Branco	Região centro
25	Broa-70	Branco	Vouzela, Sacorelhe
26	Broa-164	Amarelo	Celorico da Beira, Moinho do Pardo
27	Amiudo C0S003	Amarelo	VASO
28	Broa-93	Amarelo	Viseu, Boa aldeia
29	Amiudo (C3) 97	Amarelo	VASO
30	Bastos C0S0 96	Branco	VASO
31	Amiudo 2009	Amarelo	VASO
32	Broa-213	Amarelo	São Pedro do Sul, Aldeia de Manhouce
33	Pigarro C009	Branco	VASO
34	Pigarro C0 (C3) 08	Branco	VASO
35	BS22	Amarelo	USA
36	Algarro 08	Amarelo	VASO
37	Pop45xPig	Branco	-
38	NDB 1011	Amarelo	USA
39	Broa-218	Amarelo	São Pedro do Sul, Covas do Monte
40	Broa-217	Branco	São Pedro do Sul, Covas do Rio
41	Broa-187	Branco	Oliveira do Hospital, Ervedal da Beira
42	CV 2004 (#50)	Amarelo-alaranjado	VASO
43	VA 2003	Branco	VASO
44	CV 2009	Amarelo-alaranjado	VASO
45	VA 2009	Branco	VASO
46	CV C0S0 94	Amarelo-alaranjado	VASO
47	CX Estica 95	Amarelo	VASO
48	CX Fisga 95	Amarelo	VASO
49	Fan06xPig	Amarelo	-
50	Fan 2008	Amarelo	VASO
51	Aljezur 2006	Amarelo	VASO

A avaliação da cor das amostras foi feita visualmente e foram também medidos os parâmetros cromáticos com um iluminante D65. Os valores obtidos encontram-se na Tabela a, Anexo I e foram determinados por outra equipa do projeto

Relativamente à informação disponível para cada tipo de amostra em estudo:

- “ACCNº”: estas amostras foram cedidas pelo Banco Português de Germoplasma e variam entre si no ano de colheita (ACCNº ##);

- “Broa”: estas amostras correspondem a variedades tradicionais cultivadas em diferentes zonas da região da Beira Litoral e Interior, zonas com altitudes e condições ecológicas diferentes (Broa ##) (Vaz Patto, *et al.*, 2007);
- “CMSPH”: são amostras cedidas pelo Centro de Melhoramento Silas Pego Hallover e que apresentam ciclos de seleção diferentes (CMSPH ##);
- “Amíudo”: estão relacionadas com dois ciclos de seleção massal² (Amíudo ##);
- “Bulk”: resulta de uma mistura de diversas variedades tradicionais;
- “Alzejudo”: esta amostra resulta de um cruzamento entre a amostra “Alzejur” e “Amíudo”;
- “Bastos”: a denominação desta amostra está relacionada com o nome do produtor e corresponde também a um determinado ciclo de seleção;
- “Pigarro”: é uma variedade de ciclo médio, branca e do tipo *flint*, caracterizada por produzir pão com elevada qualidade. Apresenta elevado teor em cinzas (teor proteico), o que afeta o pH durante a fermentação, influenciando a qualidade da broa (Vaz Patto, *et al.*, 2009);
- “BS22”: provem de uma população americana e que poderá servir como padrão e termo comparativo, visto ser uma população amplamente estudada e caracterizada internacionalmente;
- “Algarro”: resulta do cruzamento entre a variedade “Alzejur” e “Pigarro”;
- “Pop45xPigarro”: resulta do cruzamento entre uma população cultivada na ESAC (pop45) com a variedade pig;
- “NDB”: pertence a uma população americana;
- “Castro Verde” (CV): é uma variedade amarela com maturidade tardia e do tipo *flint*, apresenta diferenças no ciclo de seleção (CV #) (Vaz Patto, *et al.*, 2009);
- “Verdeal de Aperrela” (VA): variedade do tipo *flint*, branca e quase extinta apresenta diferenças no ciclo de seleção (VA #) (Vaz Patto, *et al.*, 2009);
- “CX Fisga” e “CX Estica”: estão relacionadas com o tipo de metodologia usada para obtenção destas variedades;

² Tipo de seleção que se pratica no milho

- “Fan06xPig”: resulta do cruzamento entre as variedades “Fandango” (do ano de 2006) e “Pigarro”;
- “Fandango” (Fan): variedade mais doce que a “Pigarro”, é amarela e do tipo *flint* (Vaz Patto, *et al.*, 2009);
- “Alzejur”: variedade amarela, tipo *flint* de grupo heterótico diferente do grupo heterótico a que pertence a variedade “Amiúdo”. Quando se cruzam estas duas populações vai ocorrer um grande vigor híbrido na população resultante (Vaz Patto, *et al.*, 2009);

Em relação à amostra 37 (Pop45xPig) e 49 (Fan06xPig) não se encontra descrita a proveniência, uma vez que estas resultam de cruzamentos entre amostras (Fandango e Pigarro) também apresentadas na Tabela 4.

Por sua vez, algumas das variedades utilizadas neste trabalho surgem descritas por Vaz Patto *et al.*, 2009, sendo estas variedades tradicionais melhoradas num projeto denominado Vaso (Moreira *et al.*, 2008)³.

De realçar que de uma forma geral o número associado a cada amostra (##) está relacionado com o ciclo de seleção e que as siglas C e S, correspondem a ciclo de seleção e “selfing” (auto-fecundação), respetivamente (ex: Bastos C0S0 96).

Todas as amostras analisadas foram moídas num moinho Falling Number 3100 (Figura 10) no laboratório do INIA/UITA, em Oeiras.



Figura 10: Moinho utilizado para a obtenção da farinha de milho (moenda)

³ O projeto VASO consiste num projeto desenvolvido na região do Vale do Sousa de Portugal, iniciado em 1984 por Silas Pêgo com o apoio do CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center) de forma a responder às necessidades dos “pequenos” agricultores.

Após a moagem obteve-se para cada amostra de milho a respetiva farinha integral (proveniente da moagem do grão de milho inteiro), que foi armazenada em embalagens de plástico (Figura 11) e guardadas à temperatura ambiente.



Figura 11: Embalagens das diferentes farinhas de milho

As amostras de farinhas foram entregues no laboratório de Química Analítica do ITQB/IBET e armazenadas a - 20°C até análise.

3.2 Análise de Compostos Voláteis por SPME-GC/MS

Para a análise destes compostos recorreu-se à cromatografia gasosa associada à espetrometria de massa (GC/MS), tendo-se procedido à extração da amostra através da técnica de micro-extração em fase sólida (SPME).

3.2.1 Preparação das amostras de farinha de milho para análise

Para otimização das condições para extração dos compostos voláteis por SPME-GC/MS foi utilizada uma farinha de milho de uma marca comercial. Foram otimizados os seguintes parâmetros: quantidade de farinha, tempo e temperatura de extração, efeito da adição de água e repetibilidade da fibra.

Inicialmente, pesou-se 1g de farinha para um “vial” de 15mL de tampa roscada, e testou-se a quantidade de água a adicionar, utilizando-se 1,2,3,4 e 5mL de água ultra pura. Esta mistura foi homogenizada num vortex. De seguida, estabeleceu-se uma relação ótima entre a quantidade de farinha e água, sendo esta relação de 1:2, tendo sido analisadas amostras com diferentes quantidades, mas igual proporção de farinha: água: 0,5g de farinha + 1mL de água, 1g de farinha + 2mL de água e 2g farinha + 4mL de água. Procedeu-se em seguida à análise dos compostos voláteis nas amostras nas condições otimizadas:

- as amostras de farinha comercial foram preparadas num “vial” com um agitador, adicionando 2g da farinha a 3mL (para a amostra de marca comercial) de água desionizada de forma a formar uma “papa” com aspeto homogéneo, por agitação numa placa magnética durante 15 minutos;
- na preparação das amostras do projeto usou-se um volume de água de 4,5mL e não de 3mL como otimizado e referido anteriormente para as amostras de marca comercial, uma vez que estas amostras eram mais finas e não formavam uma “papa” homogénea com os 3mL de água. Pretende-se uma “papa” homogénea e não a existência de grânulos de farinha em pó e para isso o volume de água de 4,5mL foi suficiente. A alteração do procedimento permitiu garantir uma maior homogeneidade nas amostras que foram preparadas em triplicado, salvo algumas exceções assinaladas no texto, em que a quantidade de amostra era insuficiente.

3.2.2 Reagentes

A água ultra pura (18.2 MΩ.cm) usada foi obtida a partir de um equipamento de Millipore-Direct Q3 UV system (Millipore, USA).

Utilizou-se uma mistura padrão de hidrocarbonetos C8-C20 (contem C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20; 40 mg/L cada, em hexano) da Fluka, para identificação de compostos voláteis pelos índices de retenção.

3.2.3 Equipamento

Foram testadas diferentes fibras para concentração das amostras por microextração em fase sólida tendo sido escolhida a de DVB/Carboxen/PDMS 2cm-50/30µm da SUPELCO, para a análise das 51 amostras de farinha.

A análise dos compostos voláteis foi executada num cromatógrafo acoplado a um espectrómetro de massa (GCMS-QP2010 Plus Shimadzu) e equipado com uma coluna capilar Varian Factor Four, DB - 5MS da J & W Scientific (30m x 0,25µm x 0,25µm) (Figura 12).



Figura 12: GC/MS utilizado na análise de compostos voláteis.

Este equipamento tem acoplado um amostrador automático AOC-5000 (Shimadzu). O sistema de aquisição de dados usado foi o programa GCMSsolution.

3.2.4 Otimização das condições de análise

Para a concentração das amostras por SPME testaram-se diferentes fibras: DVB/CAR/PDMS 50/30, PDMS -100, PDMS/DVB-65 e PA -85 μ m e para a análise por GC/MS testaram-se dois modos de injeção: *split* (razão 1:5) e *splitless*.

Estudou-se o efeito da temperatura: 40, 50, 60 e 70°C e o efeito do tempo de exposição da fibra: 10,20,30,40, 50 e 60 minutos. Depois da otimização dessas condições realizaram-se seis ensaios de repetibilidade para avaliar a variabilidade dos resultados.

3.2.5 Condições de análise utilizadas

Após as otimização das condições de análise (tempo de exposição 60 minutos, temperatura de extração 60°C e modo splitless) procedeu-se à análise das amostras no cromatografo de fase gasosa nas seguintes condições: injetor a 250°C, no modo “splitless”, os compostos foram dessorvidos e analisados numa coluna DB- 5MS, com o seguinte programa de temperaturas: 35°C durante 5 minutos, seguindo-se um aumento gradual de 5°C/min até uma temperatura final de 230°C. A interface e a fonte de iões no equipamento de MS estavam a 250°C. Os espectros de massa no modo de impacto de eletrões (EI) foram gerados a 70eV e foram recolhidos na gama de m/z de 29 a 299, com uma velocidade de varrimento de 555 scans s⁻¹. O gás transportador era o hélio e o fluxo era de 2,1mLmin⁻¹.

3.2.6 Tratamento de dados

O *software* LabSolutions GCMSsolution Release 2.53SU1 foi usado para a análise das áreas dos compostos presentes nos cromatogramas das diferentes amostras.

A identificação dos compostos voláteis presentes nas amostras foi efetuada por comparação dos espectros de massa dos compostos da biblioteca de espectros do *software* (WILEY 229 e NIST 27 e 147) com os espectros de massa obtidos

experimentalmente. A identificação dos picos nos cromatogramas foi feita com base numa lista de possíveis compostos em que é dado o índice de semelhança (IS) que é atribuída a esse pico. Por vezes surge mais do que um composto com o mesmo índice de semelhança, o que implica a confirmação da identificação dos compostos, utilizando misturas padrão para comparação de tempos de retenção e o cálculo dos fatores de retenção linear (índice de Kovats). Estes fatores foram calculados a partir de uma equação (1) matemática e comparados com os referenciados na bibliografia (The pherobase, 2011).

(1)

$$LRI = 100 * \left(\frac{t_c - t_n}{t_{n+1} - t_n} + n \right)$$

onde: LRI - índice de retenção linear; t_c - tempo de retenção do composto de interesse; t_{n+1} - tempo de retenção do hidrocarboneto posterior; n - nº de carbonos do hidrocarboneto anterior.

Para tratamento estatístico foi utilizado a ferramenta de análise de dados do Excel, nomeadamente Anova e teste *t*- Student. Para a análise de componentes principais utilizou-se o *software* NTSYS pc version 2.20N, que permite a análise de dados multivariados.

3.3 Análise de Compostos Fenólicos por espectrofotometria e cromatografia

Procedeu-se à otimização das condições de preparação de extratos de farinha de milho, nomeadamente no que se refere à quantidade de amostra, melhor solução extratante e proporção de farinha: solvente extratante.

Para quantificação dos compostos fenólicos totais utilizaram-se duas técnicas: a técnica de Folin-Ciocalteu por espectrofotometria e efetuou-se a determinação da área total do cromatograma obtido por HPLC-DAD a 280nm. Os flavonóides totais foram quantificados espectrofotometricamente e os flavonóis a partir da determinação da área total do cromatograma a 360nm.

Os mesmos extratos foram utilizados para avaliação da atividade antioxidante pelo método de ORAC e HORAC.

3.3.1 Preparação das amostras de farinha de milho para análise

A extração dos compostos fenólicos foi efetuada a partir de um procedimento reportado na literatura por Lopez Martinez, *et al.*, (2009) e que sofreu algumas alterações ao longo do processo de optimização, nomeadamente na quantidade de farinha utilizada e no solvente extratante, uma vez que no trabalho referenciado foram utilizadas 5g de farinha, EtOH/H₂O (80:20 v/v) como solvente extratante.

Para extração dos compostos fenólicos, inicialmente utilizaram-se 20mg de farinha de milho (marca comercial) que foram extraídos com 10mL uma solução EtOH/H₂O (50:50 v/v), que garantiam uma concentração mínima do extrato inicial, com base nos valores de fenóis totais reportados por Lopez Martinez, *et al.*, (2009).

No entanto, no decorrer da otimização verificou-se que a quantidade de farinha não era adequada para as análises e passou-se a utilizar 2 g de farinha de milho extraída com 20 mL de uma solução de EtOH/H₂O (50:50 v/v) durante 15 minutos por homogeneização no Ultra Turrax T25 da JANKE & KUNKEL IKA® Labortechnik. Após o processo de extração, filtrou-se a solução com um papel de filtro de Whatman (tipo 42: retenção 2,5 µm, diâmetro 18,5 cm) e o filtrado foi guardado em frascos devidamente rotulados e rolhados, que foram congelados a -20°C até posterior análise. Para cada amostra procedeu-se à preparação de extratos em triplicado.

3.3.1.1 Reagentes

A água ultra pura (18.2 MΩ.cm) usada foi obtida a partir de um equipamento de Millipore-Direct Q3 UV system (Millipore, USA), o EtOH (99,9%) era da Carlo Erba Reagents e a acetona (≥99,9%) foi adquirida da Sigma- Aldrich.

3.3.1.2 Otimização das condições de análise

Para extração dos compostos fenólicos das amostras testaram-se vários solventes (10mL) para 2mg de farinha, de forma a verificar qual o solvente que permitia

uma melhor extração: EtOH/H₂O 20% (v/v), EtOH/H₂O 50% (v/v), EtOH/H₂O 80% (v/v), EtOH 100% e acetona.

3.3.2 Determinação do teor em compostos fenólicos totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada segundo o método de Folin Ciocalteu (Singleton, *et al.*, 1999) por espectrofotometria UV-Visível a 725nm.

3.3.2.1 Reagentes

No doseamento dos fenóis totais usou-se reagente Folin – Ciocalteu (2,0 N) da Sigma e uma solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 35%. Ácido gálico adquirido da Fluka, MetOH absoluto da Carlo Erba Reagents e Na₂CO₃ (99%) da Sigma Aldrich.

3.3.2.2 Preparação das soluções stock

Preparou-se uma solução stock de ácido gálico a 1000ppm em H₂O/MetOH (20:80). Para preparação da solução stock de ácido gálico pesou-se 5mg de ácido gálico e dissolveu-se em solução H₂O/MetOH (20:80) num balão volumétrico de 5mL. Desta solução pipetou-se 500 µL para um balão volumétrico de 5mL e fez-se o volume com solução H₂O/MetOH (20:80) para obter uma solução de ácido gálico de 100ppm. A solução stock foi guardada num frasco rolhado e rotulado e armazenada no frigorífico (T=5°C) até posterior utilização.

Para preparação da solução de Na₂CO₃ a 35 %, pesou-se 35g para um balão de 100mL, agitou-se até total dissolução e fez-se o volume com água ultra-pura.

3.3.2.3 Preparação das soluções padrão de ácido gálico

A solução stock foi utilizada na preparação das soluções padrão na gama de concentração 1 a 6ppm (Tabela 5).

Tabela 5: Concentração dos padrões de ácido gálico pretendidos e respectivos volumes de solução a pipetar. Nota: Completou-se o volume de cada balão com uma solução de $H_2O/MetOH$ (20:80)

Concentração (ppm)	Volume a pipetar da solução mãe ($V_{final}= 5ml$)
1	50 μL
2	100 μL
4	150 μL
4	200 μL
5	250 μL
6	300 μL

3.3.2.4 Análise das amostras de farinha de milho

Retirou-se 200 μL de extrato que foi colocado num balão volumétrico de 10mL e perpez-se o volume com água ultra pura. Desta solução fez-se uma toma de 3,5mL e adicionou-se 100 μL de reagente Folin-Ciocalteu e após 3 minutos 400 μL de solução de Na_2CO_3 (35%), agitou-se a solução em vortex e deixou-se em repouso durante 1h. Mediu-se a absorvância a 725nm em célula de vidro de 1cm e utilizando como branco água ultra pura.

Relativamente à análise de padrões de cada solução preparada em 3.3.2.3 fez-se uma toma de 3,5mL e procedeu-se à reação de coloração da mesma forma que se descreveu para as amostras.

3.3.2.5 Equipamento

Na análise do teor de fenóis totais foi utilizado um espectrofotómetro Beckman DU-70 da Beckman Instruments (Fullerton, USA) e células de vidro de 1cm de percurso ótico.

3.3.2.6 Tratamento de Resultados

Recorrendo à equação da reta de calibração, obtida através do *software* Excel, determinou-se a concentração dos extratos preparados em EtOH/H₂O 50% e calcularam-se as concentrações médias, desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPr) dos triplicados dos extratos de farinha de milho. Para a análise de componentes principais utilizou-se o *software* NTSYS pc version 2.20N, que permite a análise de dados multivariados.

3.3.3 Determinação dos flavonóides totais por espectrofotometria

A quantificação dos flavonóides totais foi realizada segundo Çam&Hisil (2010), por espectrofotometria UV-Visível a 510nm.

Tendo em conta a pouca quantidade de extrato e para que os valores de absorvância se encontrassem na gama de concentrações da reta, os extratos foram diluídos 1:4, 1:2 e outros não foram diluídos.

3.3.3.1 Reagentes

Nitrito de sódio (NaNO₂) e cloreto de alumínio (AlCl₃) adquiridos de Sigma, hidróxido de sódio (NaOH) adquirido de Merck, catequina adquirida de ExtraSynthese e metanol adquirido de Carlo Erba Reagents.

3.3.3.2 Preparação das soluções stock

a) Solução de nitrito de sódio

Pesou-se 5g de NaNO₂, transferiu-se para um balão volumétrico de 100mL e completou-se o volume com água ultra pura, de modo a preparar-se uma solução numa concentração de 5% (p/v).

b) Solução de cloreto de alumínio

Pesou-se 10g de AlCl₃, transferiu-se para um balão volumétrico de 100mL e completou-se o volume com água ultra pura, de modo a preparar uma solução numa concentração de 10% (p/v).

c) Solução de hidróxido de sódio

Pesou-se 4g de NaOH, transferiu-se para um balão volumétrico de 100mL e completou-se o volume com água ultra pura, de modo a preparar uma solução numa concentração de 1M.

3.3.3.3 Preparação das soluções padrão de Catequina

Pesou-se 5mg de catequina e dissolveu-se em metanol. Transferiu-se este conteúdo para um balão volumétrico de 5mL e acertou-se o volume com metanol. A partir desta solução stock prepararam-se diferentes soluções de padrão (Tabela 6).

Tabela 6: Concentração dos padrões de catequina pretendidos e respetivos volumes de solução a adicionar. Nota: Completou-se o volume de cada balão com H₂O ultra pura

Concentração (ppm)	Volume a pipetar da solução stock ($V_{\text{final}} = 5\text{mL}$)
20	100 μL
40	200 μL
60	300 μL
80	400 μL
100	500 μL
120	600 μL

As soluções foram armazenadas em frascos rolhados e rotulados e armazenadas no frigorífico (5°C) até posterior utilização.

3.3.3.4 Análise das amostras de farinha de milho

Mediu-se 200 μL de cada solução padrão, adicionou-se 800 μL de água ultra pura, 60 μL de solução NaNO₂ (5%), agitou-se 5 minutos, adicionou-se 60 μL de solução AlCl₃ (10%) e aguardou-se mais 6 minutos. Por fim, adicionou-se 400 μL de solução NaOH (1M) e 480 μL de H₂O e mediu-se a absorvância em célula de vidro de 1cm a 510nm. O mesmo procedimento descrito foi efetuado para as amostras.

3.3.3.5 Equipamento

Na análise do teor de flavonóides totais foi utilizado um espectrofotômetro Beckman DU-70 da Beckman Instruments (Fullerton, USA) e células de vidro de 1cm de percurso ótico.

3.3.4 Análise dos compostos fenólicos por HPLC – DAD- ED

3.3.4.1 Preparação das amostras de farinha de milho

Os extratos que foram preparados em 3.3.1. foram concentrados no evaporador rotativo (RE111, Buchi) a 35°C até perto da secura. De seguida, redissolveu-se o extrato até se obter um volume final de 1mL, com a solução extratante EtOH/H₂O 50% (v/v). Após a redissolução o extrato foi filtrado com filtros de seringa (Whatman, 0,45µm) para os “vials” e procedeu-se à sua análise por HPLC.

3.3.4.2 Reagentes

O ácido gálico e o ácido *p*-cumárico foram adquiridos na Fluka, o ácido ferúlico, siringaldeído, ácido cafeico, 5-HMF, ácido protocatechuico, ácido *p*-hidroxibenzóico, catequina, vanilina, ácido vanílico, ácido salicílico, ácido cinâmico e ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico foram todos adquiridos na Sigma Aldrich. Canferol, canferol 3-O-glucósido, quercetina, ácido clorogénico, epicatequina, rutina, hesperidina, resveratrol, tirosol, hidroxitirosol, floridzina e floretina foram adquiridos na ExtraSynthese.

O ácido fosfórico *p.a* foi adquirido na Panreac. Acetonitrilo HPLC *gradient grade* adquirido na VWR.

3.3.4.3 Equipamento

Na análise por HPLC, utilizou-se um equipamento da marca Thermo Finnigan (modelo Surveyor) (Figura 13) equipado com amostrador automático, bomba e detetor de díodos (DAD). Foi ainda utilizado um detetor eletroquímico (ED) da Dionex ligado à saída do detetor de díodos.



Figura 13: Sistema de HPLC-DAD-ED utilizado

3.3.4.4 Condições de análise

Utilizou-se uma coluna RP-18 (5 μ m) 250 \times 4 – Lichrocart[®] com uma pré-coluna RP-18 (5 μ m) em forno termostaticado a 35°C, tendo sido o volume de injeção de 20 μ L.

Quando do processo de otimização das condições de análise testaram-se três métodos de análise por HPLC. De forma a verificar qual dos métodos seria o mais adequado para a nossa amostra:

- Método I: os eluentes usados foram: A – Solução de ácido fosfórico 0,1% (1mL ácido fosfórico *p.a* + 999mL água ultra pura) e B – Solução de ácido fosfórico (0,1%) + 40% ACN + 59,9% H₂O (1mL de ácido fosfórico *p.a.* + 400mL de acetonitrilo HPLC gradient grade + 599mL de água ultra pura). O programa de eluição usado ao longo da análise no HPLC está descrito na Tabela 7, tendo sido usado um fluxo de 0,7mL/min.

Tabela 7: Programa de eluentes ao longo da análise no HPLC (método I)

Tempo (min)	Eluente A	Eluente B
0,10	100,0	0,0
15,0	80,0	20,0
25,0	80,0	20,0
70,0	30,0	70,0
75,0	30,0	70,0
85,0	0,00	100,0
100,0	0,00	100,0
101,0	100,0	0,00
110,0	100,0	0,00

- Método II: difere do método I no tempo de análise e no programa de eluentes. Os eluentes usados foram, A – Solução de Ácido fosfórico *p.a* em água ultra pura (0,1%), B - Acetonitrilo. O programa de eluição usado ao longo da análise no HPLC está descrito na Tabela 8, tendo sido usado um fluxo de 0,7mL/min. As restantes condições de análise foram semelhantes ao método I.

- Método III: permitia obter perfis semelhantes aos obtidos no equipamento de HPLC-MS/MS. O programa de eluentes encontra-se descrito na Tabela 9. As restantes condições de análise foram semelhantes ao método I.

Tabela 8: Programa de eluentes ao longo da análise no HPLC (método II)

Tempo (min)	Eluente A	Eluente B
0,10	100,0	0,0
52,00	10,0	90,0
70,00	10,0	90,0
71,00	100,00	0,0
80,00	100,00	0,0

Tabela 9: Programa de eluentes ao longo da análise no HPLC (método III)

Tempo (min)	Eluente A	Eluente B
0,10	97,00	3,0
5,00	89,00	11,0
13,00	81,00	19,0
25,00	81,00	19,0
50,00	33,50	66,50
51,00	97,00	3,00

O detetor de díodos usado fez varrimento de 200 a 798nm a uma velocidade de 1Hz e uma largura de banda de 5nm, 3 canais individuais (254, 280 e 360nm) com uma velocidade de 10Hz e uma largura de banda de 11nm. As condições do método de deteção estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10: Condições de deteção no detetor de díodos

Detetor				
Tempo de análise (min)	110			
Tempo de aquisição (seg)	2			
Varrimento	Máx c.d.o. (nm)	Mín c.d.o (nm)	Largura da banda (nm)	Velocidade (Hz)
	192	798	5	1
	C.d.o (nm)	Largura da banda (nm)	Velocidade de aquisição de dados (Hz)	
c.d.o A	254	11	10	
c.d.o B	280			
c.d.o C	360			

O detetor eletroquímico tinha na sua constituição um eléctrodo de carbono vítreo e efetuou medições de sinal por voltametria integrada em gamas de potenciais entre -1.0V a 1.0V com um varrimento no tempo de 1.00s.

3.3.4.5 Experiências relativas ao teor de fenóis totais

De forma a compreender os resultados obtidos pelos dois métodos de quantificação do teor de fenóis totais (Folin-Ciocalteu e HPLC) e para verificar se ocorrem perdas nos diversos passos de preparação dos extratos de farinha de milho, nomeadamente nos passos de filtração e concentração, realizaram-se diversas experiências que se explicam em seguida.

- Experiência 1

Tinha como objetivo principal quantificar o teor em fenóis totais por espectrofotometria (Folin-Ciocalteu) e pelo perfil cromatográfico a 280nm em diversos extratos que foram sujeitos ao processo de concentração descrito em 3.3.4.5. Pretendia-se confirmar qual o fator de concentração que estava realmente a ser aplicado às amostras e se ocorriam perdas no teor de fenóis totais quando se procedia ao processo de concentração dos extratos.

Preparou-se um extrato de farinha de milho (Amostra 35) (5g de farinha em 50mL de EtOH:H₂O – 50:50, v/v) que foi agitado em Ultraturrax durante 15min, seguido de uma centrifugação durante 10 min a 3000 g , filtração no Funil de Buchner e concentrou-se o extrato no evaporador rotativo até cerca do volume que se pretendia atingir e analisar (Tabela 11). Resumidamente: concentrou-se cada extrato (Extrato1, extrato 2 e extrato 3) até um volume menor que o pretendido, retirou-se a quantidade obtida para um balão volumétrico, redissolveu-se o conteúdo que se encontrava agarrado às paredes do balão de fundo redondo com uma ligeira quantidade de extratante (de forma a redissolver o conteúdo do balão e não exceder a quantidade pretendida), que também foi adicionada ao balão volumétrico e por fim fez-se o volume, com o solvente em questão.

Tabela 11: Registro dos volumes pretendidos ao longo da concentração do extrato

Extrato	Volume (mL)
Extrato Original	40
Extrato 1	20
Extrato 2	10
Extrato 3	5

Para cada extrato retirou-se uma alíquota de 1mL (exceto extrato 2 e 3, que se retirou 2 e 3mL, respectivamente) que foram filtrados com filtro de 0.45µm e analisados por HPLC-DAD e por espectrofotometria em ensaio de Folin-Ciocalteu. Para a análise espectrofotométrica de Folin-Ciocalteu os extratos foram diluídos (Tabela 12).

Tabela 12: Diluições aplicadas nos extratos preparados

Extrato	Diluição aplicada	Volume de extrato (mL)	Volume de água (mL) para completar o volume final de 10mL
Ext. Original	1:50	2	8,00
Extrato 1	1:100	1	9,00
Extrato 2	1:200	0,50	9,50
Extrato 3	1:400	0,25	9,75

- Experiência 2

Esta experiência tinha como objetivo verificar se ocorrem perdas aquando da redissolução do precipitado concentrado no balão volumétrico.

Prepararam-se 2 extratos de farinha de milho (2g de farinha em 20mL de solvente EtOH:H₂O – 50:50, v/v):

i) um extrato foi concentrado no evaporador rotativo, seguindo-se a redissolução em 1mL EtOH:H₂O (50:50, v/v) e o precipitado redissolvido foi transferido para outro balão volumétrico de 20mL. Adicionou-se EtOH:H₂O (50%) até completar o volume de 20mL (volume inicial de solvente) e fez-se uma toma de 200µL de extrato

com diluição em balão volumétrico de 10mL (diluição de 1:50) para o ensaio de Folin-Ciocalteu;

ii) no segundo extrato de farinha de milho preparado para este ensaio, após concentração até 1mL, redissolveu-se o conteúdo e fez-se o volume até 20mL dentro do mesmo balão usado na evaporação, retiraram-se do balão 200µL de extrato que foram diluídos em água até completar um volume de 10mL (diluição 1:50) para análise pelo método de Folin-Ciocalteu.

- Experiência 3

Ao realizar esta experiência pretendia-se analisar a quantidade de fenóis totais que permaneciam no “bolo de farinha”, resultante da filtração.

Preparou-se um extrato de farinha de milho da amostra 47 (2g de farinha em 20mL de solvente EtOH:H₂O – 50:50, v/v) com filtração clássica em papel de filtro tipo 42 e fez-se uma toma de 200µL de extrato com diluição em balão volumétrico de 10mL (diluição de 1:50) para o ensaio de Folin-Ciocalteu. Procedeu-se à lavagem do filtro (do “bolo”) com 10mL de solvente EtOH:H₂O (50%, v/v) no final da filtração e realizou-se a análise espectrofotométrica do filtrado recolhido após toma de 200µL de extrato com diluição em balão volumétrico de 10mL (diluição de 1:50) para ensaio de Folin-Ciocalteu.

- Experiência 4

Esta experiência foi realizada com o intuito de estudar a influência do tamanho do poro do filtro, nos resultados e com o objetivo compreender a possível interferência da filtração na análise espectrofotométrica, uma vez que as partículas da farinha são muito pequenas e podem estar em suspensão, interferindo com as leituras no espectrofotómetro

Fez-se uma toma de 200µL de um extrato previamente preparado (A47) com diluição em balão volumétrico de 10mL (diluição de 1:50) para o ensaio de Folin-Ciocalteu. Seguiu-se a filtração de 1mL do extrato previamente preparado com um filtro de 0.45µm, seguida de uma toma de 200µL do extrato com diluição em balão

volumétrico de 10mL (diluição de 1:50) para o ensaio de Folin-Ciocalteu. Procedeu-se da mesma forma mas a filtração foi realizada com um filtro de porosidade 0.22µm.

3.3.4.6 Análise de compostos fenólicos solúveis e insolúveis

Os compostos fenólicos podem ser classificados como solúveis (livres e conjugados) e insolúveis.

Na preparação do extrato, anteriormente descrito, obteve-se os fenóis solúveis e com vista à extração de compostos fenólicos insolúveis, recorreu-se à extração por hidrólise alcalina.

3.3.4.6.1 Reagentes

O acetato de etilo (99,8%) foi adquirido na Labscan Limited, o ácido clorídrico (HCl) (37%) e o EtOH (99,9%) na Carlo Erba Reagents, o hidróxido de sódio (NaOH) (99%) na Merck e o hexano (95%) na Panreac Quimica.

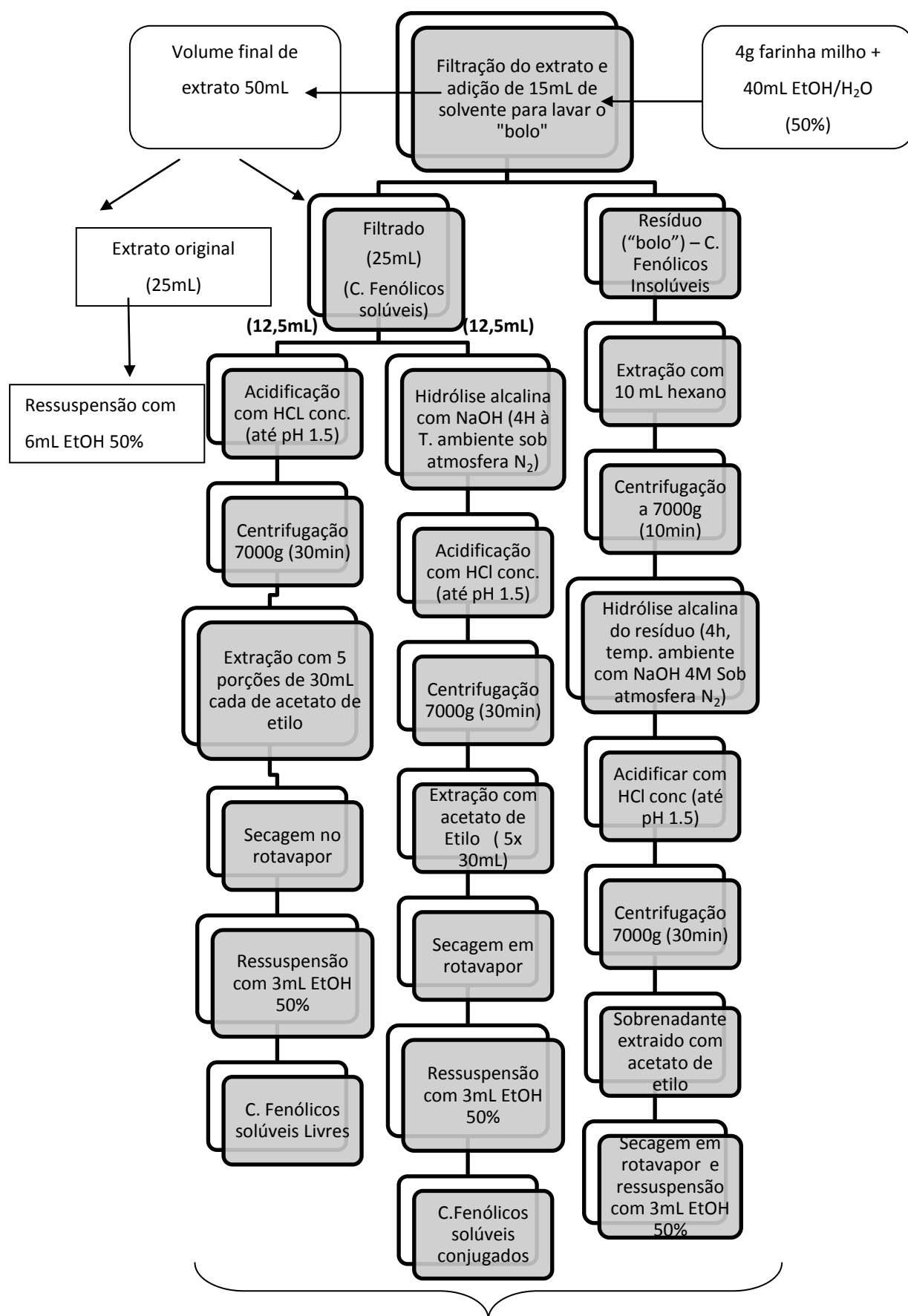
3.3.4.6.2 Extração dos compostos fenólicos

O procedimento descrito foi adaptado do procedimento reportado por Mira, *et al.*, 2008. Preparou-se um extrato com 4g de farinha de milho e 40mL de EtOH: H₂O (50% v/v), homogeneizou-se no Ultra Turrax durante 15 min, filtrou-se por vácuo, adicionou-se 25mL de EtOH:H₂O ao resíduo (“bolo” resultante da filtração) para uma reextração e foi centrifugado a 7000g. Após filtração e centrifugação obteve-se um volume final de extrato de 50mL, do qual metade foi utilizada para análise do extrato inicial (25mL) e a outra metade foi dividida em duas frações: 1- análise de compostos fenólicos livres (12,5mL) e 2- análise de compostos fenólicos conjugados (12,5mL). O “bolo” foi utilizado para análise de compostos fenólicos insolúveis. O extrato inicial para ser analisado por HPLC-DAD foi concentrado até à secura no evaporador rotativo e redissolvido até ¼ do volume inicial (6,25mL). Como tal, para as restantes frações procedeu-se da mesma forma, para serem comparadas.

Para extrair os compostos fenólicos livres procedeu-se à acidificação do extrato (12,5mL) com HCL (concentrado) até pH 1,5, centrifugação a 7000g (30min) e o sobrenadante foi extraído com 3 porções de acetato de etilo (30mL, 20mL e 20mL). Como a separação entre as fases não era nítida, em cada extração fez-se também centrifugação a 7000g (30min). Por último, evaporou-se a fase orgânica (acetato de etilo) e o extrato foi analisado por HPLC-DAD.

Para extração dos compostos fenólicos insolúveis do resíduo executaram-se 3 extrações com 10mL de hexano (utilizou-se para remover gorduras), seguindo-se uma centrifugação de 10min a 7000g, desprezou-se o sobrenadante e o resíduo foi submetido a uma hidrólise alcalina com 60mL NaOH 4M (4h à temperatura ambiente sob atmosfera inerte de N₂). Tanto para os compostos fenólicos insolúveis bem como para os solúveis seguiu-se o mesmo procedimento a partir da hidrólise alcalina, inclusivé e este foi o mesmo descrito para extração de compostos fenólicos livres. Todas as frações foram analisadas por HPLC-DAD.

De forma, a uma melhor compreensão do procedimento, a Figura 14 apresenta um esquema simplificado deste.



Análise por HPLC
Figura 14: Esquema do procedimento de hidrólise adaptado de Mira *et al.*, 2008

3.3.5 Análise dos compostos fenólicos por HPLC-MS/MS: ensaios preliminares

A análise de extratos de farinha de milho por HPLC-MS/MS com vista à identificação e quantificação de compostos fenólicos foi feita no Laboratório de Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massa (LCLEM) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

3.3.5.1 Reagentes

O ácido fórmico *p.a.* foi adquirido da Merck e o acetonitrilo grau para LC-MS era da Scharlan.

3.3.5.2 Equipamento

A análise cromatográfica por HPLC-MS/MS foi realizada num equipamento da marca Waters®, modelo Alliance 2695 Separations Module com detetores de diodos Water 996 PDA e acoplado a um espetrómetro de massa do tipo triplo-quadrupolo, Quattro micro API da Micromass®, equipado com uma fonte de electrospray (ESI). Este equipamento tem um amostrador automático. O *software* utilizado para aquisição e processamento de dados foi o Masslynx versão 4.1.

3.3.5.3 Condições de análise

Para uma primeira fase de análise das amostras de farinha de milho, de forma a obter uma caracterização geral da amostra utilizou-se um programa com um tempo de análise de 60 minutos. Os eluentes utilizados foram: A- ácido fórmico (0,5% v/v) e B- acetonitrilo (LC-MS *gradient grade*) e o programa de eluição utilizado está apresentado na Tabela 13. O fluxo usado foi de 0,3mL/min e o volume de injeção de 20µL.

A coluna utilizada era uma Synergi 2.5µm MAX-RP (100x2.00mm) da Phenomenex®, à temperatura de 35°C.

Tabela 13: Programa de eluentes ao longo da análise de no HPLC- MS/MS

Tempo (min)	Eluente A	Eluente B
0	97	3
0,10	97	3
5	89	11
13	81	19
25	81	19
50	33,5	66,5
51	97	3
60	97	3

As condições utilizadas no espectrómetro de massa tinham sido previamente usadas na análise de compostos noutras amostras. Resumidamente, inicia-se o estudo da amostra em modo SCAN, após deteção de valores de m/z nos picos nos cromatogramas, procede-se à otimização das condições de fragmentação, utilizando energia de colisão e se se pretende quantificar o composto na amostra procede-se à otimização das condições de MRM.

Na fonte de ionização foi utilizado, essencialmente, o modo negativo com o capilar a 3,00kV e o cone a 35 V. A temperatura da fonte era de 120°C e a temperatura de dessolvatação de 350°C e aplicou-se uma energia de colisão de 30eV. Para a análise por MRM, as condições no espectrometro de massa diferiram das referidas, nomeadamente no cone (20 V) e na energia de colisão (20 eV).

3.3.6 Determinação da atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante de algumas amostras foi realizada no laboratório de Nutracêuticos e libertação controlada do ITQB.

3.3.6.1 Reagentes

2',2'-Azobis (2- amidinopropano) diicloridrato (AAPH), 6-hidroxi-2,5,7,8 tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), ácido cafeico, cobalto tetrahidratado,

peróxido de Hidrogénio e ácido picolínico adquiridos na Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, França). Fluoresceína (FL) adquirido na TCI Europa (Antuérpica, Bélgica). Cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de monopotássio adquiridos na Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, França). Fosfato de sódio dibásico diidratado adquirido na Riedel-de-Haën (Seelze, Alemanha).

3.3.6.2 Método de ORAC

O teste ORAC foi realizado segundo o método realizado por Huang, *et al.*, 2005 modificado para leitores de microplacas fluorescentes FL800 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA), como descrito por Ou *et al.*, 2002.

A composição da reacção de mistura foi de 6.3×10^{-8} M FL, 1.28×10^{-2} M AAPH (preparada em 75mM PBS – phosphate buffer solution – pH 7.4) e a amostra diluída, de modo a completar um volume de 1.8 mL. Essa mistura foi colocada nos 96poços da microplaca, a 37 °C, e a reacção foi iniciada pela adição de AAPH. A Fluorescência emitida pela forma reduzida de FL foi medida numa microplaca FL800 (Bio-tek Instruments Winooski, VT, USA) e registada a cada minuto no comprimento de onda de 530 ± 25 nm de emissão após excitação no comprimento de onda de 485 ± 20 nm (espectrofotómetro de fluorescência com banho termostático, modelo Cary Eclipse,

O tampão fosfato (75mM, pH = 7,4) foi utilizado para preparar soluções de AAPH e FL e utilizado como branco. Foram utilizadas soluções de 10, 20,30, 40 e 50µmol/L de Trolox como padrões de controlo.

Os valores finais de ORAC foram calculados usando a equação de regressão entre a concentração de Trolox e a área abaixo da curva de FL. Os dados foram expressos em micromoles de equivalentes de Trolox (TEAC – do inglês Trolox equivalents antioxidant capacity) por 100g de farinha de milho.

3.3.6.3 Método de HORAC

O ensaio de HORAC foi baseado num método já descrito anteriormente (Ou *et al.*, 2002) modificado para um leitor de microplacas (FL800), descrito por Serra *et al.* (2010). Foram utilizados 10µL de cada amostra, a que foram adicionados 180µL de FL (4×10^{-3} µM), e 10µL de CoF2 (0,79 mg/ mL). A reação foi iniciada com a adição de 5µL H₂O₂ (1.1 M) numa microplaca de 96poços, colocada a 37°C. A fluorescência emitida pela forma reduzida FI foi medida e registada a cada 1min durante aproximadamente 35min. A microplaca foi lida utilizando filtros de fluorescência para comprimentos de onda de excitação de 485 ± 20 nm e de emissão de 530 ± 25 nm. O leitor de placas foi controlado pelo *software* Gen5. O ácido cafeíco foi usado como padrão. Os dados foram expressos em micromoles de equivalentes de ácido cafeico (CAE) por 100g de farinha de milho. Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

4 Resultados e Discussão

4.1 Análise de compostos voláteis nas amostras de farinha de milho

De forma a desenvolver um método de SPME – GC/MS para a análise de compostos voláteis em farinhas de milho, diferentes condições experimentais foram otimizadas, tais como o tipo de revestimento da fibra, a temperatura e tempo de extração e o efeito da adição de água à farinha de milho. Pretendeu-se assim obter uma eficiência de extração adequada e cromatogramas com um maior número de picos e maiores áreas. Também foram estudadas condições de repetibilidade e para estes ensaios, foi utilizada uma farinha de marca comercial, uma vez que as amostras do projeto em estudo não tinham quantidade suficiente para efetuar todas estas experiências.

As análises foram sempre precedidas de um “branco” e para o efetuar colocava-se a fibra no injetor do cromatógrafo de fase gasosa durante 1 min e 30 seg. Antes da análise do branco, era efetuado um acondicionamento da fibra, durante 10 minutos a 270°C no injetor do cromatógrafo, apresentando a coluna a mesma temperatura. Estes passos eram realizados de forma a remover possíveis contaminantes que estivessem na fibra e só posteriormente, após análise destes resultados, se procedia à análise das amostras.

4.1.1 Otimização das condições de SPME

4.1.1.1 Escolha do revestimento da fibra de SPME

Para seleção do melhor revestimento da fibra realizaram-se alguns ensaios, com a farinha comercial e a fibra de PDMS, DVB/Carboxen/PDMS, PDMS/DVB e PA. A escolha do melhor revestimento é uma parte essencial para o processo de otimização e depende da natureza química dos compostos de interesse.

A Figura 15 apresenta os perfis cromatográficos da farinha de milho comercial obtidos para os diferentes tipos de revestimento de fibra quando a análise foi efetuada nas mesmas condições e na Tabela 14 encontram-se identificados alguns picos e o índice de semelhança para cada um deles. É de referir que todos os picos não identificados no cromatograma (e nos seguintes) correspondem a compostos que são libertados pela própria fibra – os siloxanos. Para o tratamento de resultados, considerou-se somente a área de alguns compostos, aqueles que apresentavam os picos maiores permitindo uma integração mais correta. Estes picos “escolhidos” foram os mesmos utilizados para o tratamento de resultados nas restantes condições de otimização. Alguns deles correspondem a compostos aos quais estão associados aromas caraterísticos (Tabela 14), podendo por isso ser compostos, que se estiverem presentes em teores superiores aos limiares de deteção olfativo vão contribuir para as caraterísticas de aromas destas amostras.

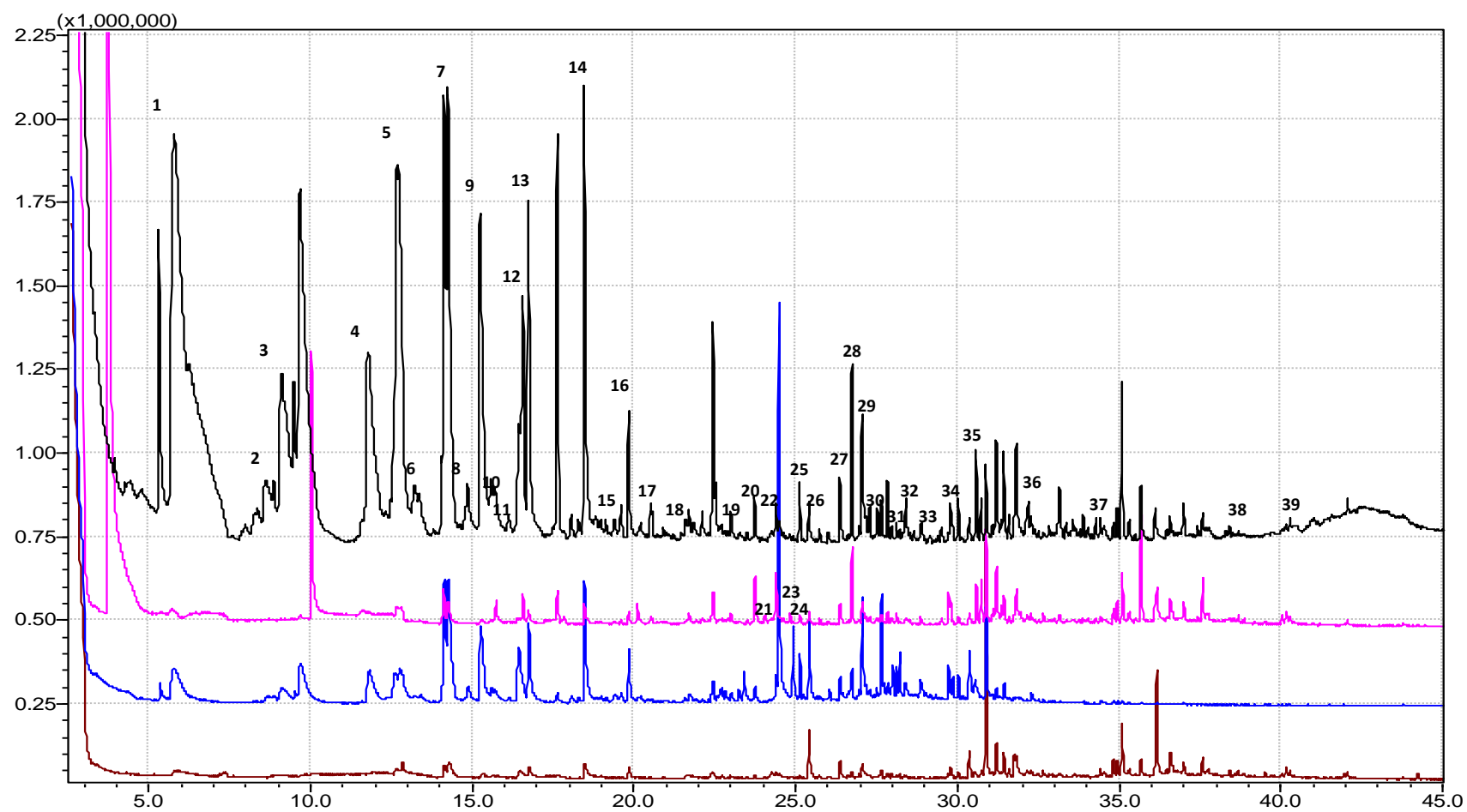


Figura 15: Perfis cromatográficos de farinha de milho comercial obtidos por GC/MS com a fibra de DVB/Carboxen/PDMS, PDMS, PDMS/ DVB e PA nas condições experimentais descritas em 3.2.5

Tabela 14: Tempo de retenção, índice de semelhança, biblioteca de espectros e aroma característico dos compostos identificados na farinha de milho comercial

Pico	Tempo de Retenção (minutos)	Composto	Índice de semelhança (%)	Biblioteca	Aroma*
1	5,739	Hexanal	94%	NIST 21	Gordura, verde, forte, penetrante
2	8,555	1-Hexanol	94%	NIST 21	-
3	9,700	Heptanal	91%	NIST 21	Óleo, gordura, doce, nozes ou fruta diluída
4	11,786	2-Heptanal (Z)	87%	WILEY 229	-
5	12,780	8- Metil - 8- pentil Hexadecano	66%	NIST 107	-
6	13,379	Octanal	91%	WILEY 229	Gordura, cítrico, mel diluído
7	14,200	3 – Etil - 2-metil, 1,3 hexadiene	89%	NIST 147	-
8	14,776	1- Cloro octano	76%	NIST21	-
9	15,278	2- Octenal (E)	96%	WILEY229	Herbáceo, verde, picante
10	15,671	1-Decanol	85%	WILEY229	Floral, frutado,cera
11	16,435	1- Butoxi - 3-metil - 2- buteno	87%	NIST107	-
12	16,697	Nonanal	96%	WILEY229	Flor, cítrico, laranja, rosa, gordura
13	16,959	Álcool fenil etílico	95%	NIST147	Floral, rosa, doce
14	18,500	2-Nonenal (E)	97%	NIST 107	Gordura, penetrante
15	19,600	Dodecano	92%	WILEY229	-
16	19,800	Decanal	97%	NIST107	Penetrante, doce, floral, cítrico
17	20,900	Éster etílico do ácido benzenoacético	95%	NIST21	-

Tabela 14 (continuação): Tempo de retenção, índice de semelhança, biblioteca de espectros e aroma característico dos compostos identificados na farinha de milho comercial

Pico	Tempo de Retenção (minutos)	Composto	Índice de semelhança (%)	Biblioteca	Bibliografia
18	21,445	1-Tetradecano	84%	NIST21	-
19	23,266	2,5,5 - Trimetil heptano	82%	NIST21	-
20	23,586	3-Decen-2-ona	82%	NIST147	Frutado, jasmim, poderoso
21	24,143	5-Hexildihidro, 2 (3H) -furanona	94%	NIST21	-
22	24,383	Butil isobutirato	91%	NIST 147	Frutado, etéreo, pele de uva
23	24,493	1 - Decanol	94%	NIST21	-
24	24,932	3 – (Z) - Tetradecano	93%	NIST107	-
25	25,111	Heptadecano	96%	NIST 21	-
26	25,400	Dodecanal	87%	NIST 21	-
27	25,736	α - Ionona	93%	WILEY229	-
28	26,373	Geranil acetona	95%	WILEY229	-
29	27,162	β - Ionona	93%	WILEY229	-
30	27,664	Heptadecano	92%	NIST21	-
31	28,011	3 - (Z), 6- (Z), 8 – (E) – Dodecatrien-1-ol	86%	WILEY229	-
32	28,139	Germacreno	83%	WILEY229	-
33	28,226	1-Formiletil - 1-benzeno	81%	WILEY229	-
34	29,716	3-Metil-1,6-heptadien-3-ol	85%	NIST 147	-

Tabela 14 (continuação): Tempo de retenção, índice de semelhança, biblioteca de espectros e aroma característico dos compostos identificados na farinha de milho comercial

Pico	Tempo de Retenção (minutos)	Composto	Índice de semelhança (%)	Biblioteca	Bibliografia
35	30,015	Hexadecano	94%	NIST21	-
36	32,264	Nonadecano	91%	WILEY229	-
37	34,937	Miristato de isopropilo	88%	WILEY229	Muito leve, praticamente inodoro, gordura não rançosa
38	38,300	Etil hexadecanoato	93%	NIST107	Leve, cera
39	40,272	6-Éster metílico do ácido octadenóico	92%	NIST 21	-

- -> Aroma não identificado na bibliografia

* -> (Flavors&Fragrance , Aldrich,2000)

A Figura 15 mostra que a fibra de DVB/Carboxen/PDMS foi capaz de adsorver compostos voláteis da farinha de milho mais eficazmente do que as restantes fibras. Verificou-se também que para a fibra de PDMS, alguns compostos com maior tempo de retenção, como o isobutil isobutirato (tr 24.403min) apresentam maior área, dado a sua baixa polaridade.

Por outro lado, alguns picos surgem maiores com a fibra de PMDS/DVB para tempos compreendidos entre os 24 e 30 minutos, como o 1-decanol e dodecanal, por exemplo. Menos compostos, são detetados quando se usou a fibra de PA, o que pode ser justificado pelo fato desta fibra ser a mais polar, apresentando maior seletividade para este tipo de compostos. Assim, as diferenças encontradas nos perfis cromatográficos obtidos com as diferentes fibras estão relacionadas com a polaridade da fibra e da competição dos compostos voláteis para os locais de adsorção (Nongonierma, *et al.*, 2006).

Para este estudo e em face dos resultados obtidos escolheu-se a fibra de DVB/CAR/PDMS, uma vez que a maior parte dos compostos com aroma apresentavam

áreas com valores superiores para esta fibra. Esta também foi a considerada por vários estudos como a mais eficiente para a extração de compostos voláteis em milho (Klensporf & Jelén 2005; Kaseleht, *et al.*, 2010).

Para realização deste estudo, realizaram-se vários ensaios em branco (Figuras a a d, Anexo II) para cada fibra e atendendo aos resultados dos ensaios em branco e a possíveis estudos futuros ou o interesse em utilizar outro tipo de fibra, é importante realçar que após a análise da farinha de milho, excluindo a fibra de PDMS, as restantes fibras ficaram contaminadas com compostos presentes na amostra. Esta contaminação pode interferir na análise de outras amostras, como tal, a fibra foi acondicionada entre a análise de diferentes amostras. A Tabela 14 mostra que a amostra é constituída essencialmente por aldeídos, álcoois, cetonas e hidrocarbonetos. Atendo aos objetivos deste estudo, a análise de compostos voláteis irá focar-se essencialmente numa família de compostos, os aldeídos, uma vez que estes são os que contribuem, maioritariamente, para o aroma de cereais (Klensporf & Jelén, 2005).

Testaram-se também dois modos de injeção: split e splitless e na Figura 16 surgem os perfis cromatográficos obtidos para ambos os modos: com o modo split obtêm-se picos melhor definidos, enquanto que pelo modo splitless se obtêm picos com maior área, para tempos de retenção menores. Assim, atendendo a que os compostos de interesse, eluem com menores tempos de retenção e que o modo splitless permite obter picos com maior área, este foi o modo escolhido. Também no trabalho realizado por Klensporf & Jelén (2005) este foi o modo de injeção utilizado. No entanto, em trabalhos futuros deverá ser avaliada a possibilidade de se utilizar o método de split dado que no método splitless há um alargamento muito grande do pico cromatográfico com baixo tempo de retenção.

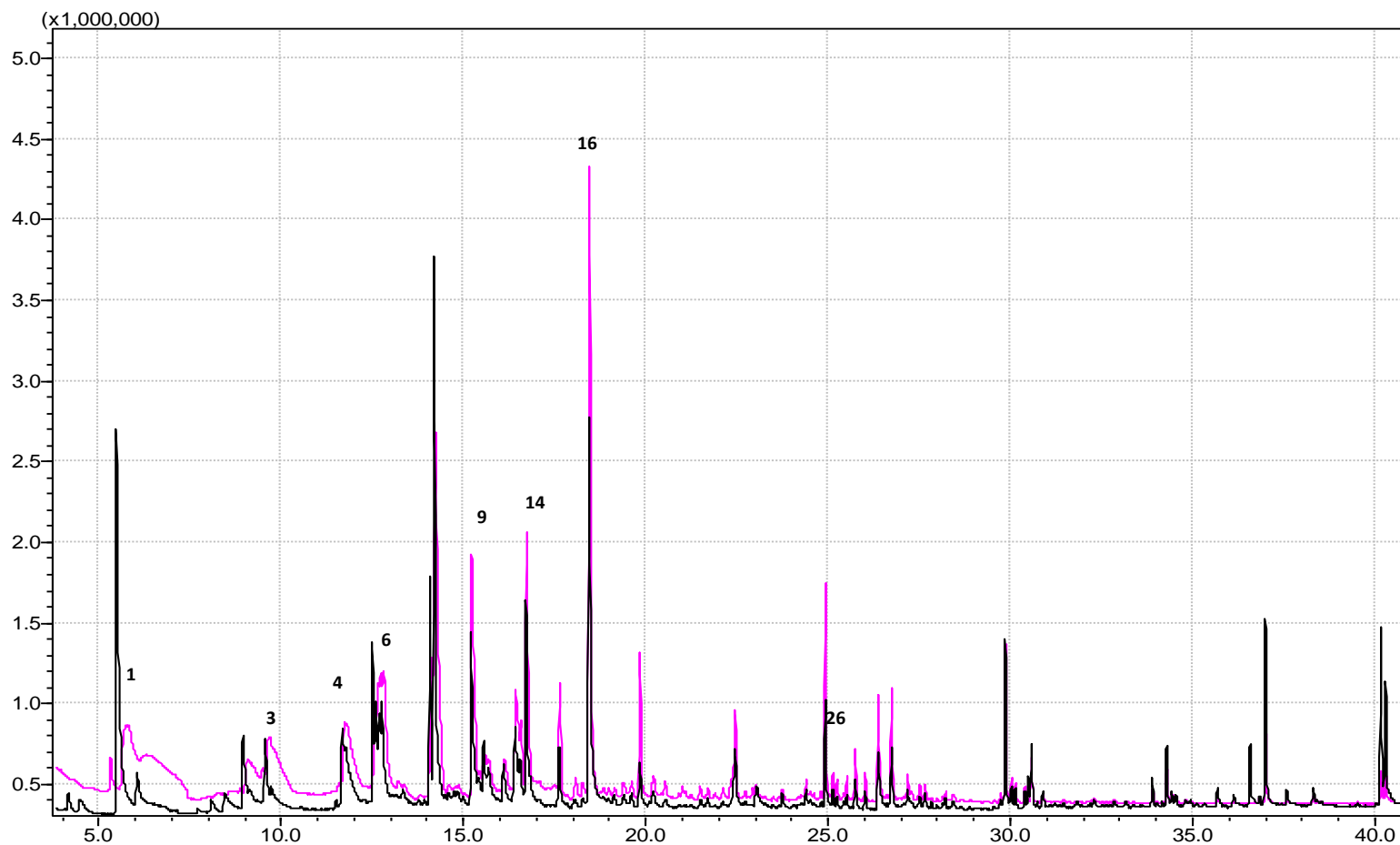


Figura 16: Sobreposição dos perfis cromatográficos de farinha de milho comercial obtidos por GC/MS em modo **Split** (5) e em modo **Splitless** com identificação dos picos correspondentes aos aldeídos

4.1.2 Otimização da preparação da amostra

4.1.2.1 Efeito da adição de água

Atendendo ao processo de preparação da broa de milho (mistura de farinha e água) avaliou-se se a adição de água e o volume utilizado aumentavam a libertação de compostos voláteis.

Inicialmente, partiu-se de uma quantidade de farinha comercial de 1 g, aquecida a 50°C (temperatura de exposição) e um tempo de concentração de 40 minutos (tempo de exposição à fibra) e estudou-se a variação da área dos compostos com a adição de diferentes volumes de água: 0, 1, 2, 3, 4 e 5 mL.

A partir das áreas dos picos obtidos na análise cromatográfica destas amostras em diferentes condições (Tabela a, Anexo II) foi possível traçar um gráfico (Figura 17) de variação das áreas em função da quantidade de água adicionada. Verificou-se que se obtêm picos com maior área utilizando 2 ou 3 mL de água.

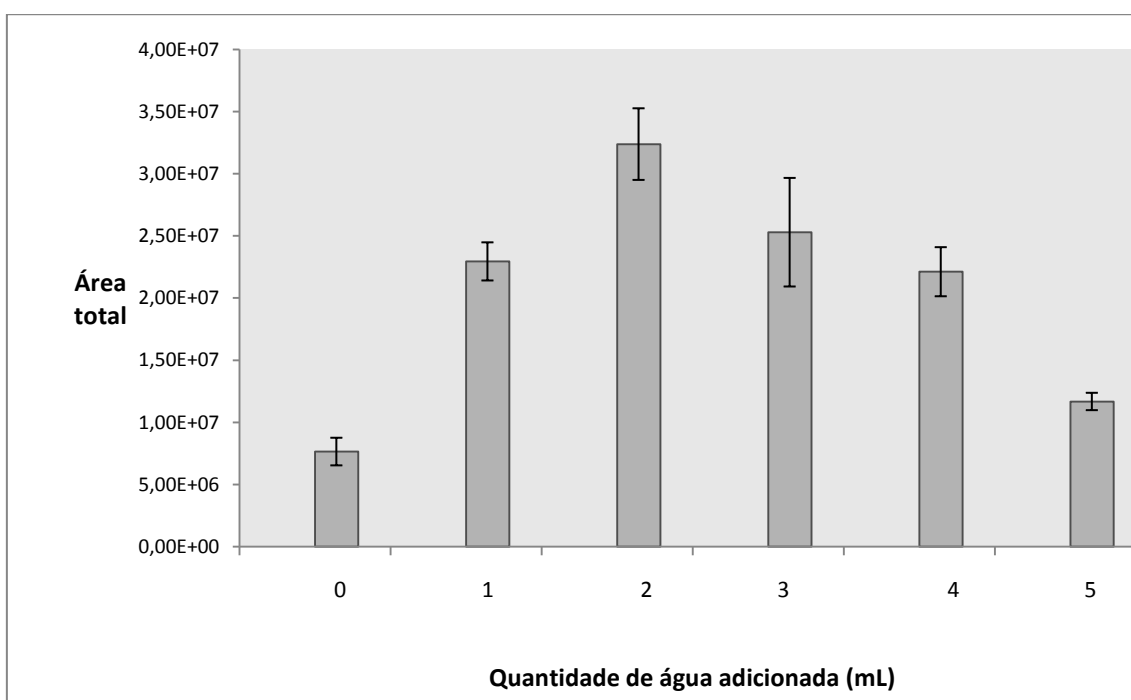


Figura 17: Variação da média da área total dos compostos obtida quando foram analisadas amostras (1g de farinha) às quais se adicionou quantidades diferentes de água e o desvio padrão (n=3)

De forma a averiguar se existem diferenças significativas entre ambas as condições, recorreu-se a uma análise estatística e pelo teste de t-Student, concluiu-se que, considerando um α de 5%, não existem diferenças estatisticamente significativas entre adicionar à farinha de milho 2 ou 3 mL de água, com um nível de significância de 95%. Considerando que para um volume de 3mL de água as variações encontradas eram superiores (DPr 17,26%), optou-se por preparar as amostras com 2mL de água.

Estudou-se qual seria a melhor quantidade de farinha (1, 2, 3 e 4g) a adicionar a 2mL de água. Testou-se a variação da área total dos compostos para as seguintes quantidades de farinha: 1:2 (m/v); 2:2 (m/v); 3:2 (m/v); 4:2 (m/v). A partir dos resultados obtidos (Tabela b, Anexo II) foi possível traçar o gráfico apresentado na Figura 18.

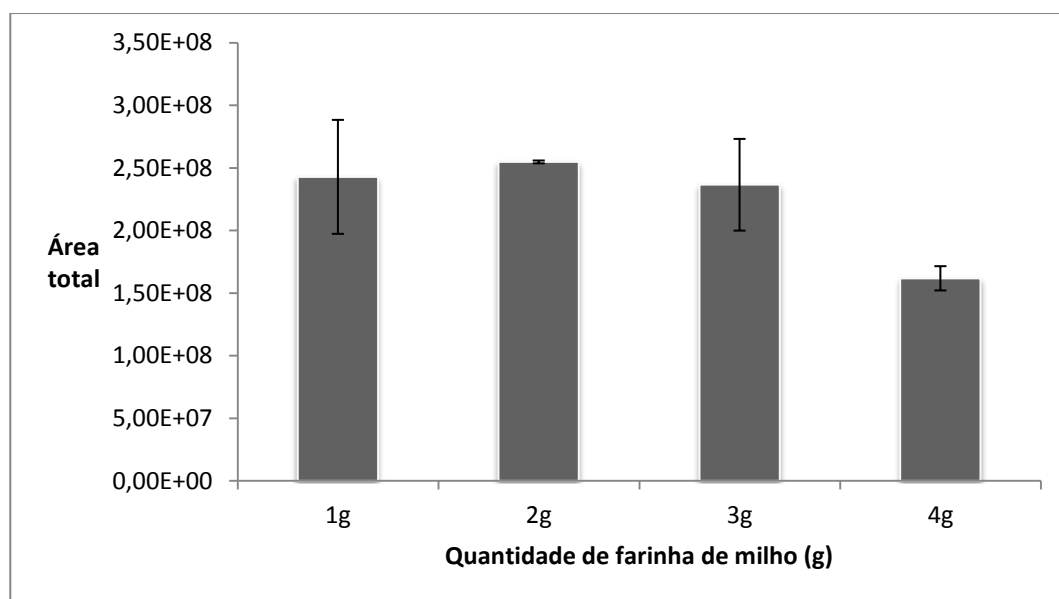


Figura 18: Variação da média da área total dos compostos obtida para cada quantidade de farinha testada (1,2,3 e 4g) adicionada a 2mL de água e desvio padrão (n = 3)

Analisando os resultados obtidos verificou-se que não existem diferenças significativas entre utilizar 1, 2 ou 3g de farinha. Com 4g de farinha obtém-se um valor de área total em compostos voláteis menor, comparativamente aos restantes. Em face dos resultados obtidos optou-se por uma quantidade de 2g, com a qual se obtiveram resultados com menor variação (menor desvio padrão das três repetições).

Nas análises seguintes verificou-se que ao preparar a amostra com as proporções 2:2 (m/v) esta não ficava com um aspeto homogéneo, o que poderia influenciar as restantes análises. Assim, de forma a garantir que todas as amostras ficassem homogéneas, alterou-se a quantidade de água a adicionar, sendo que a proporção 2:3 (m/v) foi a utilizada para as restantes análises de otimização.

4.1.2.2 Efeito da temperatura de extração

Após a escolha do tipo de revestimento para a fibra (DVB/Carboxen/PDMS) e a quantidade de farinha e água a usar, determinou-se a temperatura ótima de extração de forma a obter picos com maior intensidade para a maioria dos compostos.

A temperatura é uma variável importante, geralmente valores mais altos proporcionam condições para uma maior extração, no entanto, a escolha da temperatura a utilizar deve ser adequada a cada matriz, de forma a não alterar a sua composição inicial (Klensporf & Jelén, 2005). As temperaturas de 40,50,60 e 70°C foram as estudadas, com um tempo de extração de 60 minutos.

Os resultados obtidos (Figura 19 e Figura 20) mostram que ocorre um aumento da intensidade dos picos com o aumento da temperatura. Este aumento da intensidade dos picos pode ser explicado pelo fato de temperaturas mais elevadas permitirem maior e mais rápida volatilização dos compostos.

A maior resposta do detector foi observada para uma temperatura de 70°C, no entanto como esta temperatura apresenta um valor de DPr superior e atendendo a que um aumento de temperatura pode provocar alterações na composição da amostra, nomeadamente o favorecimento de reações de oxidação lipídica e de Maillard (Klensporf & Jelén, 2005). Embora este fato, aparentemente, não se tenha verificado, visto que não surgiram novos picos (somente aumentaram de tamanho) nos cromatogramas das amostras (Figura 19), a temperatura escolhida para este estudo foi de 60°C.

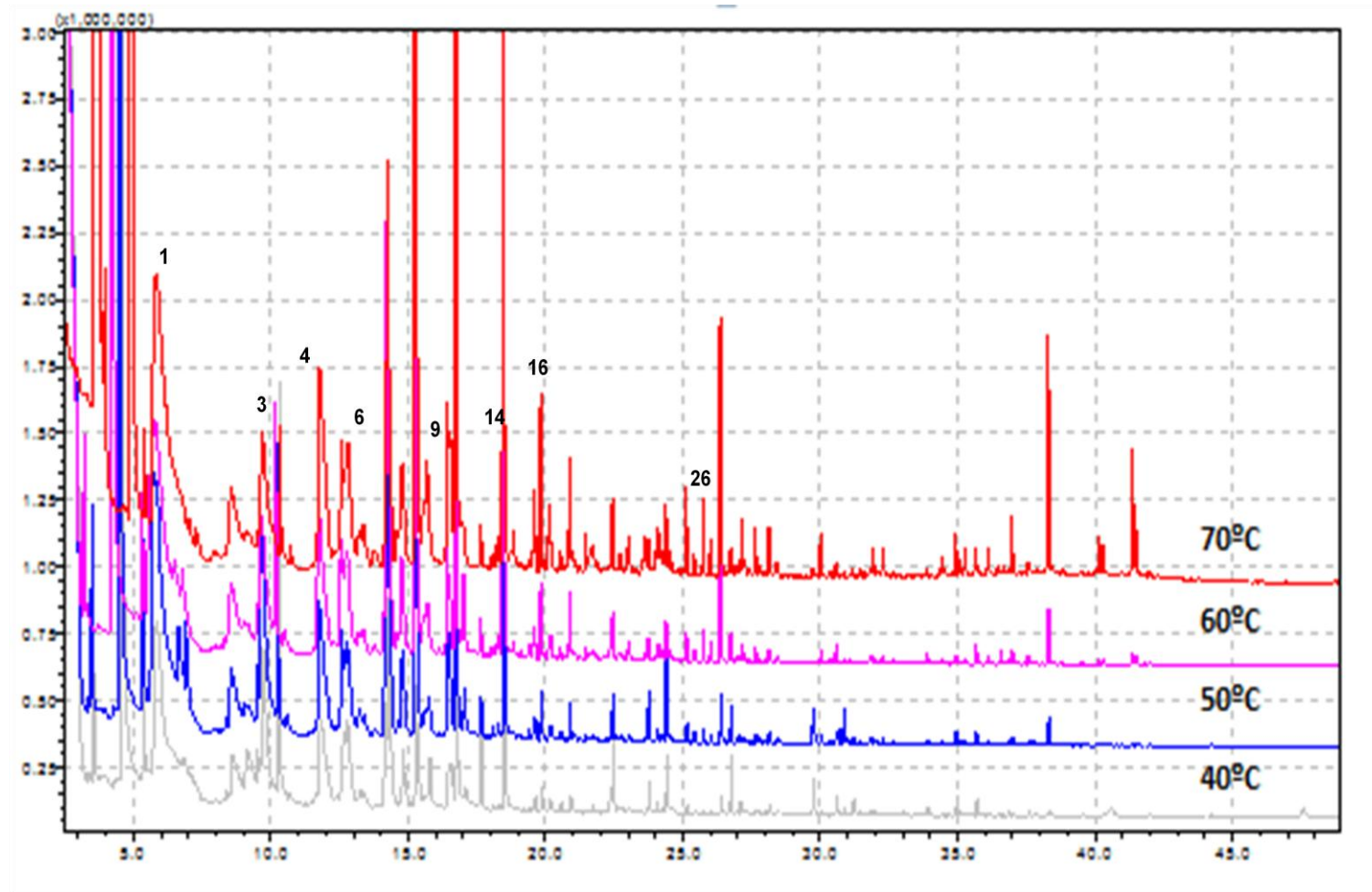


Figura 19: Sobreposição dos perfis cromatográficos de farinha comercial obtidos por GC/MS para cada temperatura de extração, bem como a numeração dos picos correspondentes aos aldeídos mencionados (farinha com água e tempo de extração de 60 minutos)

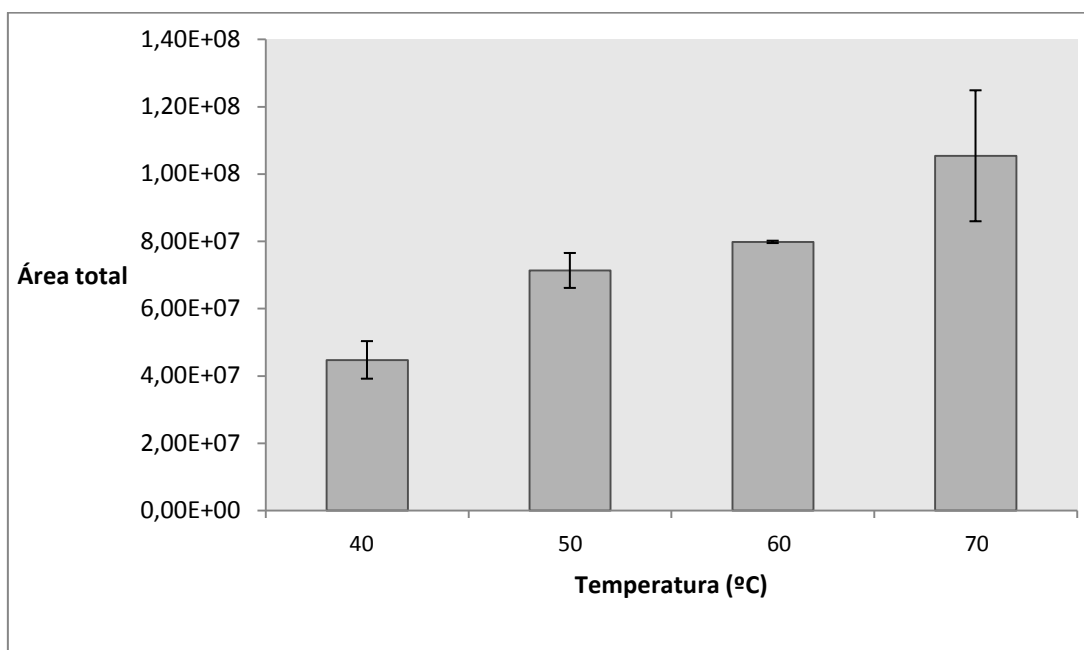


Figura 20: Variação da média da área total dos compostos obtida em função da temperatura de extração e o respetivo desvio padrão (n=3)

Com base nos resultados obtidos (Tabela c, Anexo II), as análises seguintes foram realizadas com a temperatura de 60°C e procedeu-se ao estudo do efeito do tempo de extração.

4.1.2.3 Efeito do tempo de extração

O tempo de extração influencia fortemente a eficiência de extração e pode afetar os limites de deteção do método analítico, uma vez que corresponde ao tempo de concentração da amostra na fibra (Klensporf & Jelén, 2005).

Foi avaliado o efeito do tempo de extração: 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos, utilizando uma temperatura de extração de 60°C e para tal utilizou-se, mais uma vez, a farinha comercial.

Atendendo aos perfis cromatográficos (Figura 21) verifica-se que, de uma maneira geral, há um aumento da intensidade dos picos com o aumento do tempo de exposição, principalmente para os tempos de retenção até 20 minutos.

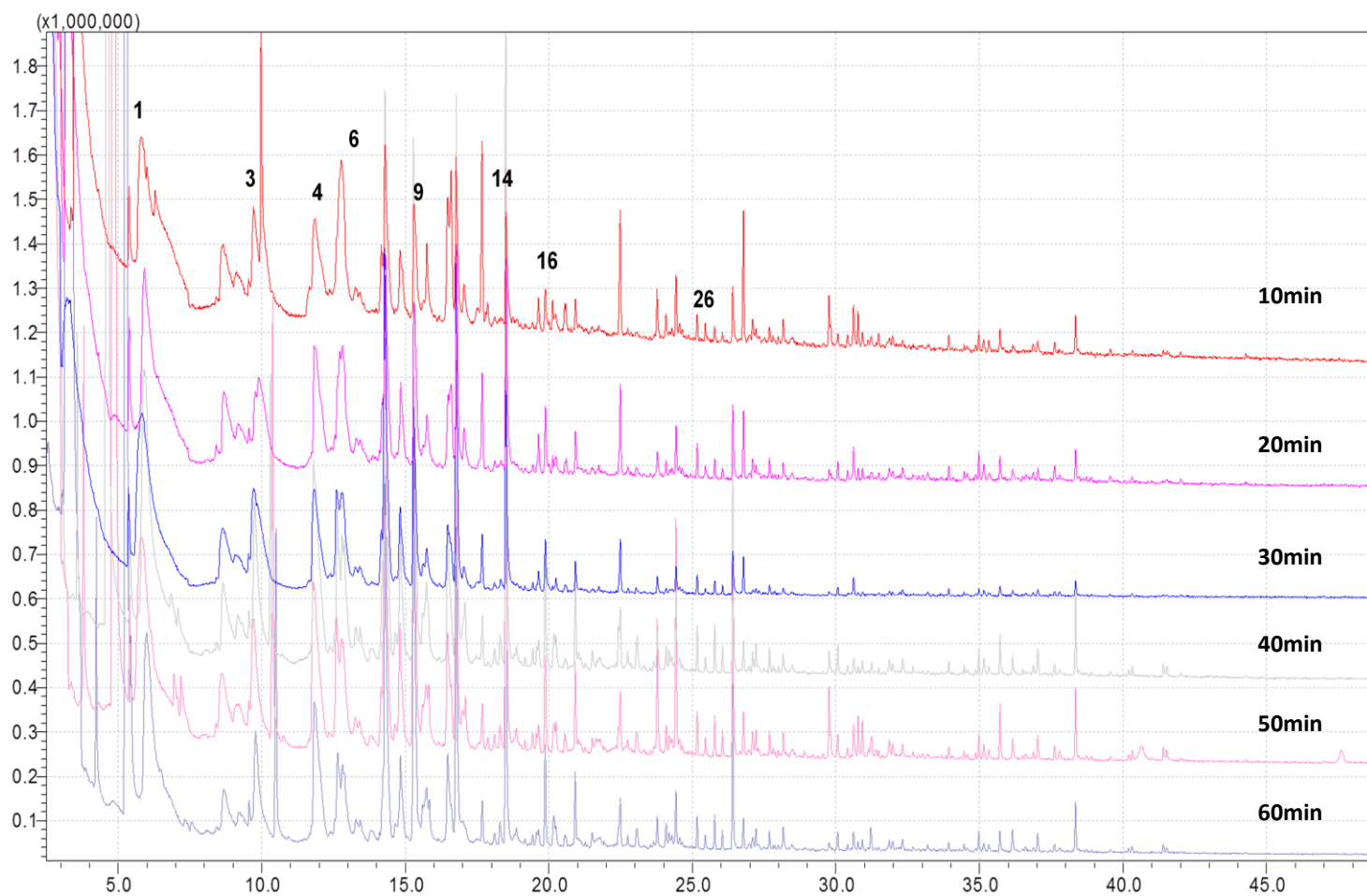


Figura 21: Sobreposição dos perfis cromatográficos de farinha comercial obtidos por GC/MS para cada tempo de extração, bem como a numeração dos picos correspondentes aos aldeídos mencionados (farinha com água e temperatura de extração de 60°C)

Com os valores das áreas dos compostos (Tabela d, Anexo II) foi possível traçar o gráfico da área *versus* tempo de extração de forma a concluir acerca da variação da área dos picos (Figura 22).

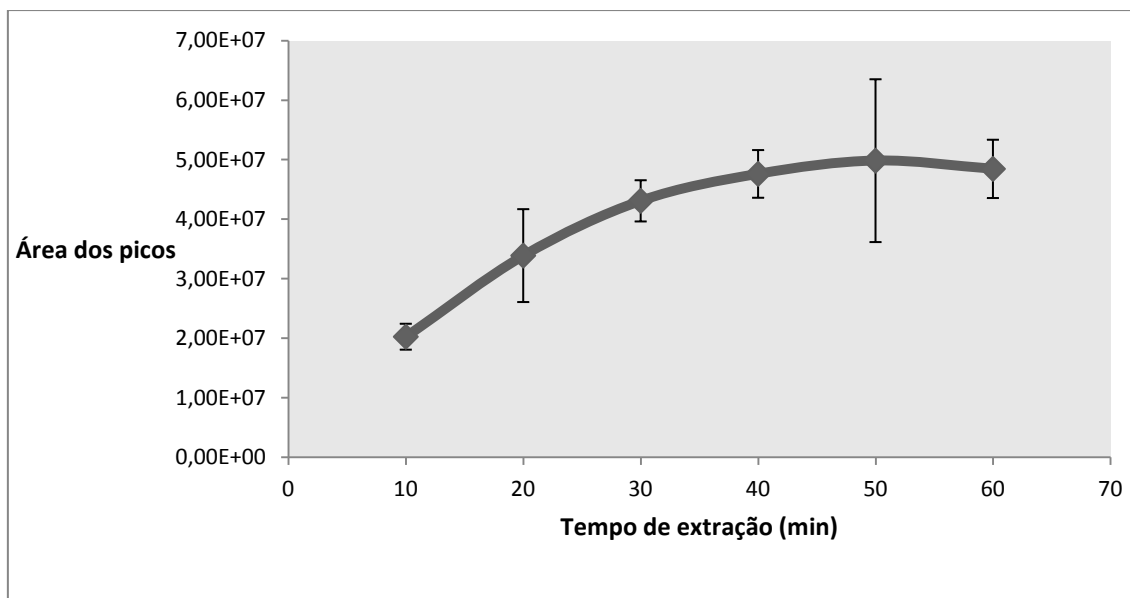


Figura 22: Variação da média da área total dos compostos em função do tempo de extração e o respetivo desvio padrão (n=3)

Face aos resultados e atendendo aos valores dos desvios padrão obtidos, pode-se concluir que não existem diferenças significativas entre os tempos de 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. No entanto, verifica-se também que a partir dos 50min a área dos compostos tende a permanecer constante.

Por sua vez, os tempos de exposição de 40, 50 e 60 minutos são os que permitem obter perfis cromatográficos com picos de maior área, embora para os 60 minutos ocorra um ligeiro decréscimo. Atendendo a que não são significativamente diferentes e que um tempo de 60 minutos permitia maior rentabilidade do trabalho prático, na medida em que cada análise no GC decorre durante 48 minutos e a coluna demora cerca de 12 minutos até atingir a temperatura inicial, para nova análise, os 60 min foi o tempo escolhido para as restantes análises de otimização e para análise das amostras do projeto em questão.

4.1.2.4 Estudo da repetibilidade da fibra

Para avaliar a repetibilidade do método de extração com a amostra de farinha comercial utilizou-se a fibra de DVB/CAR/PDMS e as condições de análise otimizadas anteriormente. A repetibilidade permite avaliar a consistência dos resultados das medições sucessivas, nas mesmas condições de análise.

Para um dos ensaios foram feitas seis análises (Tabela e, Anexo II) da amostra preparada em frascos diferentes (Figura 23). Atendendo a que as análises são feitas em triplicado, realizaram-se também 3 ensaios (Figura 24), com o passo de acondicionamento da fibra (limpeza da fibra, durante 10min, com o injetor a 270°C) entre cada um (ensaio 1) e 3 ensaios sem o passo de acondicionamento entre eles (ensaio 2).

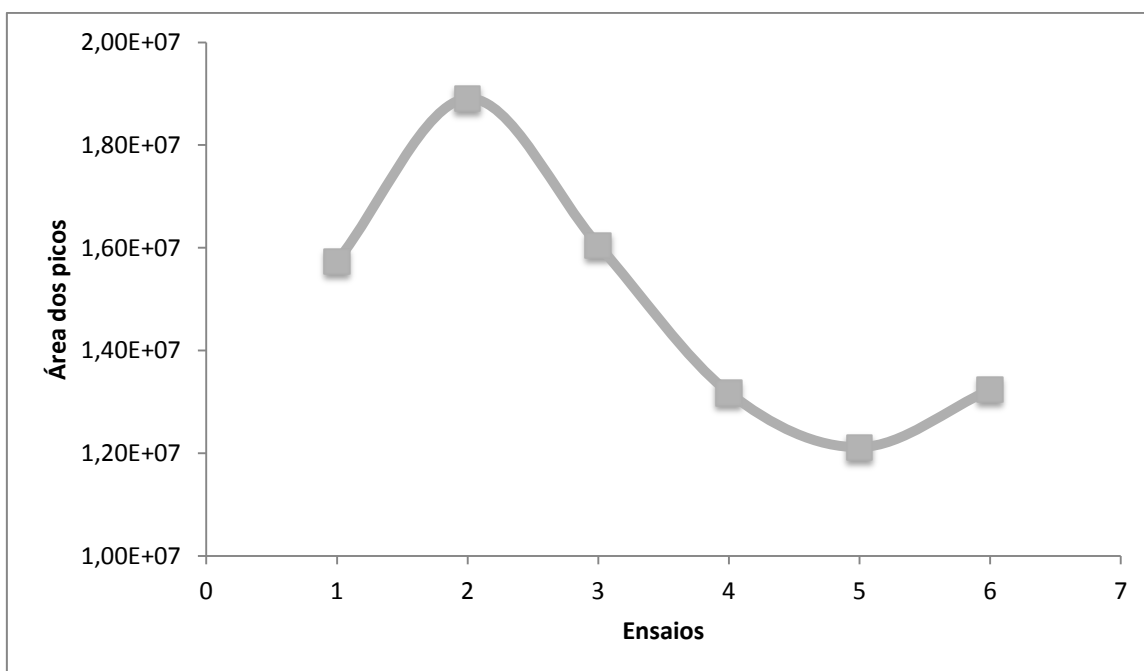


Figura 23: Variação da média da área dos compostos ao longo do ensaio sem acondicionamento entre análises (DPr= 16,88%)

Testou-se o acondicionamento da fibra entre ensaios e sem acondicionamento (Figura 24).

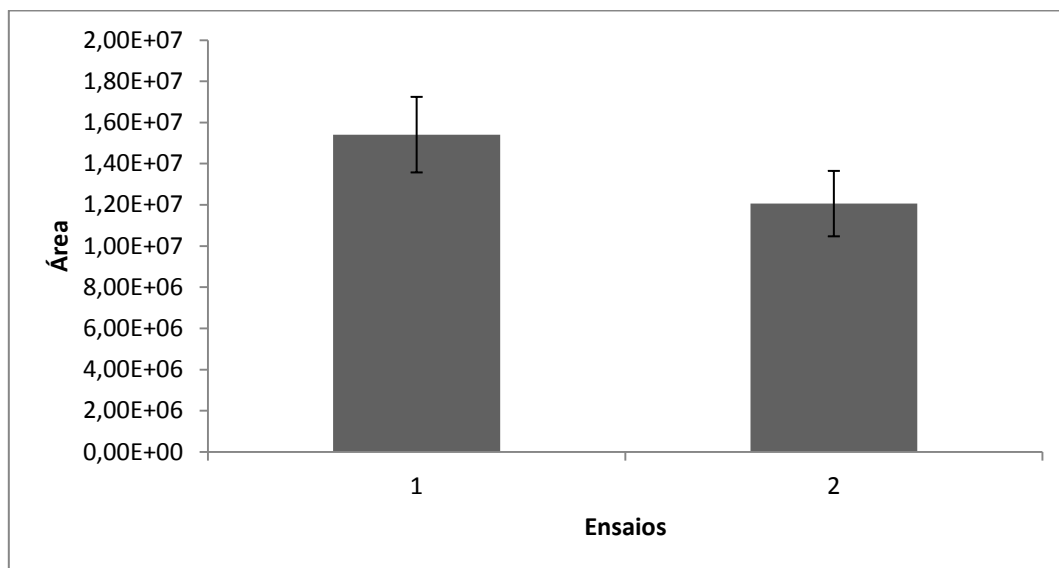


Figura 24: Variação da área dos compostos ao longo dos ensaios; 1: com acondicionamento entre ensaios (n= 3, DPr =5,7 %); 2: sem acondicionamento entre ensaios, (n=3, DPr=0,53%)

Os resultados da Figura 24 mostram que não existem diferenças significativas entre acondicionar entre ensaios ou não. Optou-se por não acondicionar a fibra entre ensaios, de forma a não tornar o trabalho mais longo, no entanto, atendendo à capacidade da fibra para adsorver compostos, tal como já foi referido em relação aos ensaios brancos, obtidos após análise da farinha de milho, a fibra entre análise de diferentes amostras (independentemente do numero de ensaios realizados) deverá ser acondicionada.

4.1.2.5 Estudo da presença de aldeídos na farinha de milho

O estudo da composição química das amostras de farinha centrou-se na família de compostos, os aldeídos, que são os compostos voláteis maioritários.

Segundo Klensporf & Jelén (2005) os aldeídos são os compostos que aparecem maioritariamente em amostras de farinhas, sendo estes também responsáveis pelo aroma característico que estas possam apresentar. Assim, procedeu-se ao estudo da

variação da área de alguns aldeídos, identificados, ao longo da variação da temperatura de exposição.

A Figura 25 apresenta o perfil cromatográfico de uma amostra de farinha de milho comercial analisada a diferentes temperaturas de extração, onde são identificados alguns aldeídos.

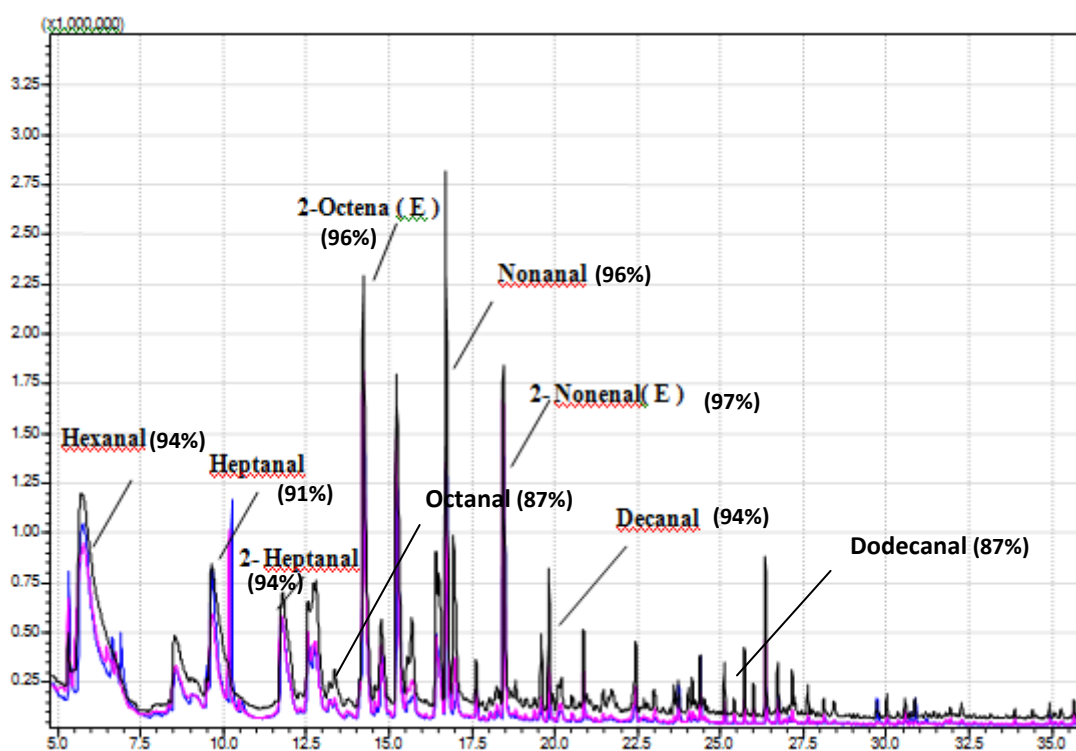


Figura 25: Sobreposição dos perfis cromatográficos de farinha de milho comercial obtidos por GC/MS para 50°C, 60°C e 70°C, bem como a identificação dos compostos e o índice de semelhança

A partir da área obtida (Tabela f, Anexo II) para cada composto nas diferentes temperaturas foi possível observar a variação da área destes compostos com a temperatura (Figura 26). Dada a importância desta família de compostos também se fez o estudo da variação da área (Tabela g, Anexo II) ao longo dos tempos de extração (Figura 27).

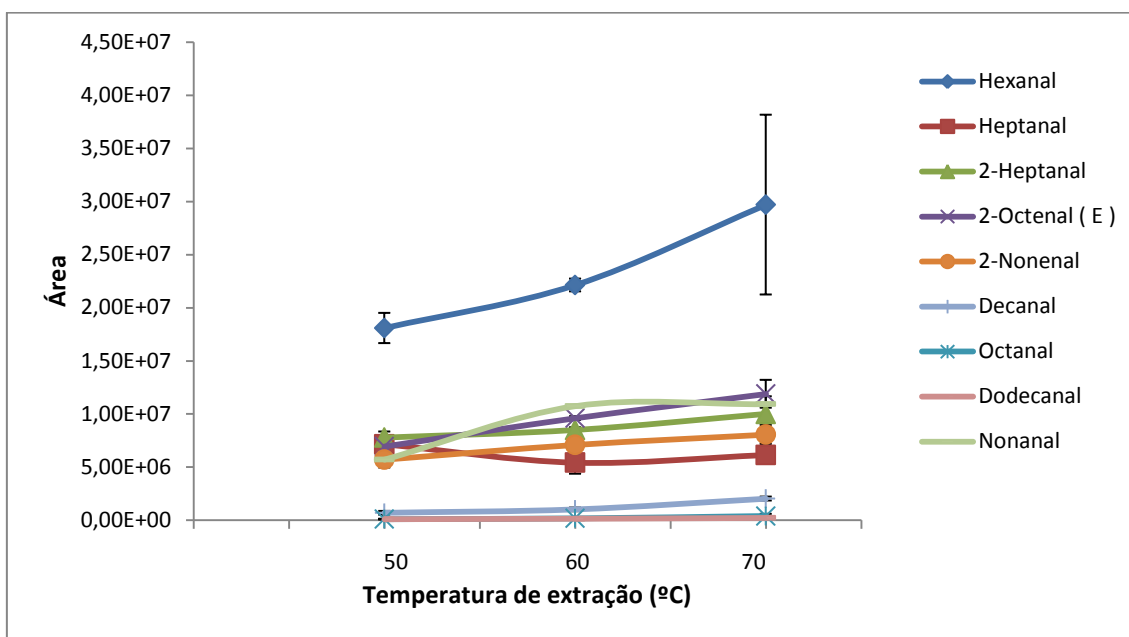


Figura 26: Variação da média da área total dos aldeídos ao longo dos ensaios de temperatura de extração bem como o desvio padrão (n=3), com tempo de extração de 60 minutos

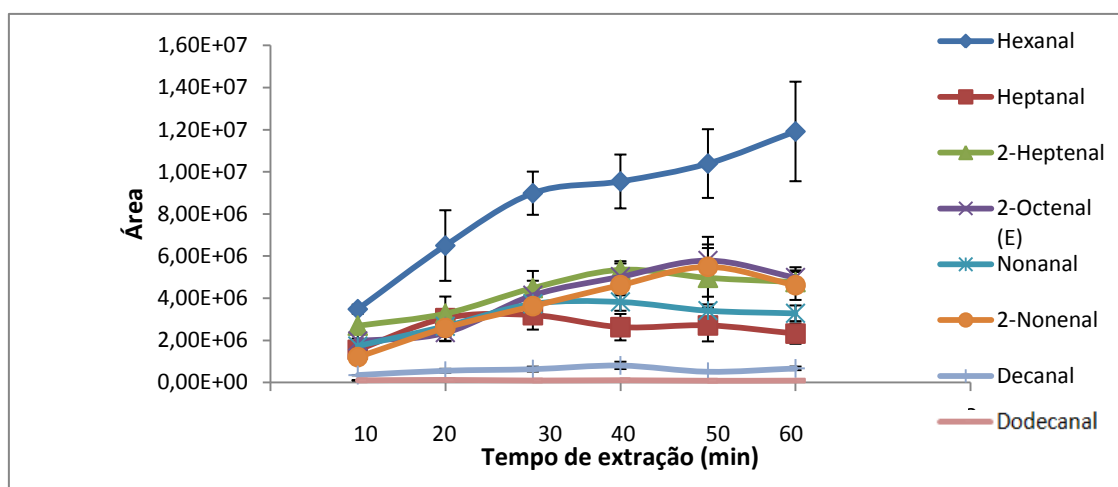


Figura 27: Variação da média da área total dos aldeídos ao longo dos ensaios de tempo de extração (minutos) bem como o desvio padrão (n=3), com temperatura de extração de 60°C

A análise do gráfico da Figura 26 mostra que o composto que apresenta maior área é o hexanal, podendo ser considerado como aldeído mais significativo na farinha (Klensporf & Jelén, 2005) e que de uma forma geral para os aldeídos, com exceção para o heptanal a área aumenta com o aumento da temperatura.

Analisando a Figura 27 mostra que ocorre um aumento das áreas dos compostos com o aumento do tempo de extração, exceto para o 2-nonenal e 2-octenal (E), onde se verifica um ligeiro decréscimo dos 50 para os 60 minutos. No entanto, este decréscimo não é relevante de acordo com o tempo de concentração escolhido (60 minutos), também se consegue obter uma elevada área média para estes compostos.

O octanal não foi considerado neste estudo em função do tempo de extração, uma vez que para tempos abaixo dos 50 minutos de retenção, o composto apresenta picos pequenos e pouco definidos, o que dificulta a sua integração. Assim, mantiveram-se as condições otimizadas e procedeu-se à análise das amostras em estudo.

4.1.3 Estudo de amostras de farinha de milho

Analisaram-se várias amostras de farinha de milho (Tabela 4) por GC/MS com a fibra de DVB/CAR/PDMS e o tempo e temperatura de exposição de 60min e 60°C, respetivamente. Para as amostras em estudo passou-se a utilizar uma quantidade de 4,5mL de água, uma vez que os 3mL de água, usados na otimização com a amostra comercial, não eram suficientes para homogeneizar as amostras em estudo. Portanto a proporção: 2: 4,5 (m/v) será a considerada para a preparação de amostras. Este estudo incidiu sobretudo numa análise qualitativa de forma a identificar os principais compostos responsáveis pelo aroma e a estabelecer uma comparação entre amostras.

Para as diversas amostras obtiveram-se cromatogramas com perfis semelhantes ao apresentado na Figura 28. O perfil cromatográfico mostra que as amostras apresentam na sua composição um número elevado de compostos e as variações entre as amostras referem-se à área dos picos detetados e não ao aparecimento de novos compostos. Os compostos foram identificados através da

comparação do seu espectro de massa com os espectros da biblioteca NIST (21 e 147) e WILEY229 existentes no equipamento.

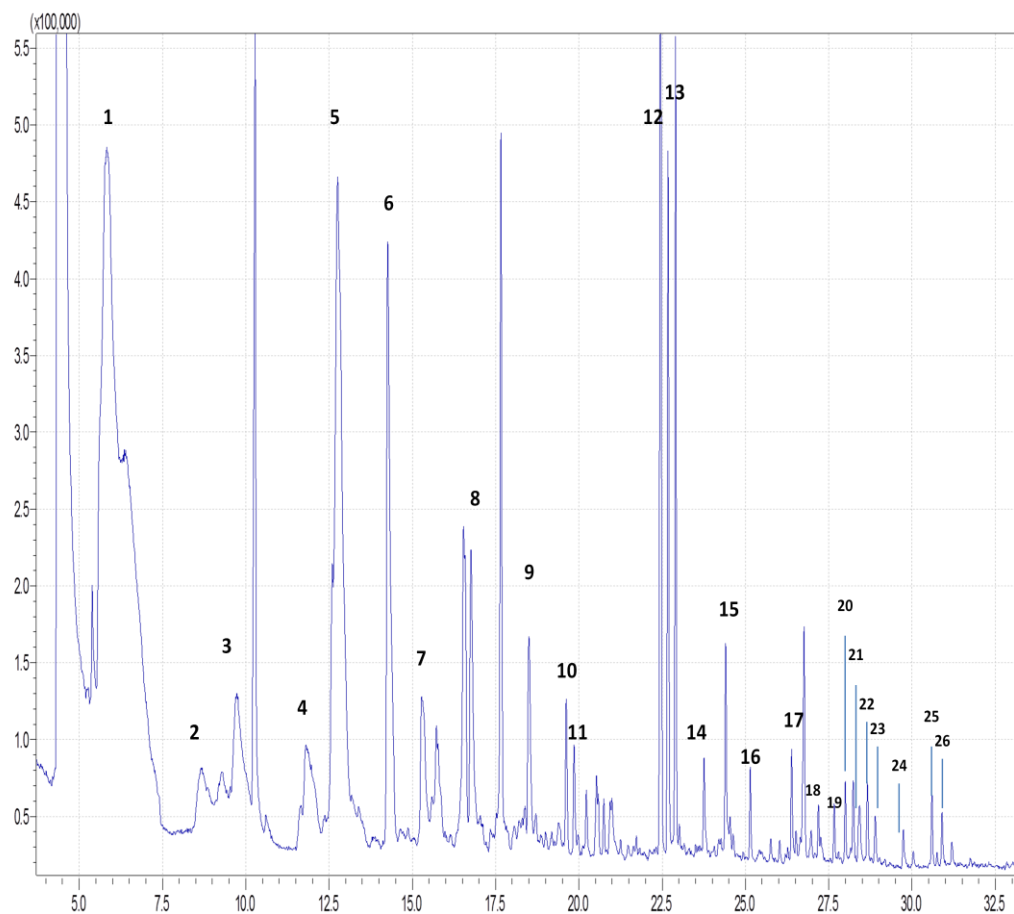


Figura 28: Perfil cromatográfico característico de uma amostra de farinha de milho obtido por GC/MS (a identificação dos picos numerados encontra-se descrita na Tabela 15)

Verifica-se que os compostos encontrados são maioritariamente aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos, tal como se tinha verificado para os resultados apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Identificação de compostos nas amostras de farinha de milho. Extração feita durante 60min a 60°C com uma fibra DVB/CAR/PDMS

Nº pico	Tempo de retenção (min)	Possível Composto	(IS) %	Família de compostos	Biblioteca	Aroma **
1	5,826	Hexanal	93	Aldeído	NIST21.LIB	Gordura, verde, forte, penetrante
2	8,665	1-Hexanol	94	Álcool	WILEY 229.LIB	-
3	9,731	Heptanal	86	Aldeído	WILEY 229.LIB	Óleo, gordura, doce, nozes ou fruta diluída
4	11,672	2-Heptenal (Z)	84	Aldeído	WILEY 229.LIB	-
5	12,808	2-Pentilfurano	84	Furano	WILEY 229.LIB	Cereal cozido**
6	14,262	3- Nonine	89	Hidrocarboneto	NIST21.LIB	-
7	15,305	2-Octenal (E)	90	Aldeído	WILEY 229.LIB	Herbáceo, verde, picante
8	16,758	Nonanal	94	Aldeído	WILEY 229.LIB	Flores, cítrico, laranja, rosa, gordura
9	18,501	2- Nonenal (E)	92	Aldeído	WILEY 229.LIB	Gordura, penetrante
10	19,619	Dodecano	90	Hidrocarboneto	NIST21.LIB	Cereal cozido**
11	19,853	Decanal	92	Aldeído	WILEY 229.LIB	Penetrante, doce, floral, cítrico
13	22,901	7-metil -1-Undeceno	92	Hidrocarboneto	WILEY 229.LIB	-
14	23,754	Isobutil 3-hidroxi-2,2,4-trimetilpentanoato	87	Éster	NIST147.LIB	-
15	24,406	Isobutil isobutirato	89	Éster	WILEY 229.LIB	Frutado, etéreo, pele de uva
16	25,143	Tetradecano	92	Hidrocarboneto	WILEY 229.LIB	-
17	26,394	14,8-dimetil - 7-Nonadien-4-ol	90	Álcool	NIST147.LIB	-
18	26,972	3,3-dimetil octano	87	Hidrocarboneto	NIST21.LIB	-
19	27,662	Pentadecano	87	Hidrocarboneto	NIST147.LIB	-
20	27,997	1-cloro octadecano	90	Hidrocarboneto	NIST21.LIB	-
21	28,454	7-metil-1- Undeceno	84	Hidrocarboneto	NIST147.LIB	-
22	28,660	7-metil- 1- Undeceno	88	Hidrocarboneto	NIST147.LIB	-
23	28,897	2-propil-1 - Heptanol	82	Álcool	NIST147.LIB	-
24	29,739	Anidrido de ácido isobutirico	85	Ác. Carboxílico	NIST147.LIB	-
25	30,899	2-Hexeno	80	Hidrocarboneto	NIST21.LIB	-
26	31,192	3,5,5-Trimetil-1-hexeno	84	Hidrocarboneto	WILEY 229.LIB	-

- -> Aroma não identificado na bibliografia/estudos anteriores

* -> (Flavors&Fragrance (2000), Aldrich)

** -> (Limpawattanna M., et al,2010)

Uma análise cuidada da identificação de compostos, mostrou que alguns dos compostos detetados podem resultar de uma contaminação da amostra por parte do plástico da embalagem e não são por isso caraterísticos da farinha de milho.

De forma a verificar esta possível contaminação foi pedida à equipa de laboratório uma amostra que não tivesse estado em contato com o plástico da embalagem e realizou-se uma análise de comparação. A Figura 29 mostra a comparação dos perfis cromatográficos para uma amostra em contato com plástico e para a amostra embalada em vidro. Compararam-se ainda (Figura 30) os perfis cromatográficos de uma amostra embalada em plástico e conservada à temperatura ambiente e de congelação (- 20 Cº).

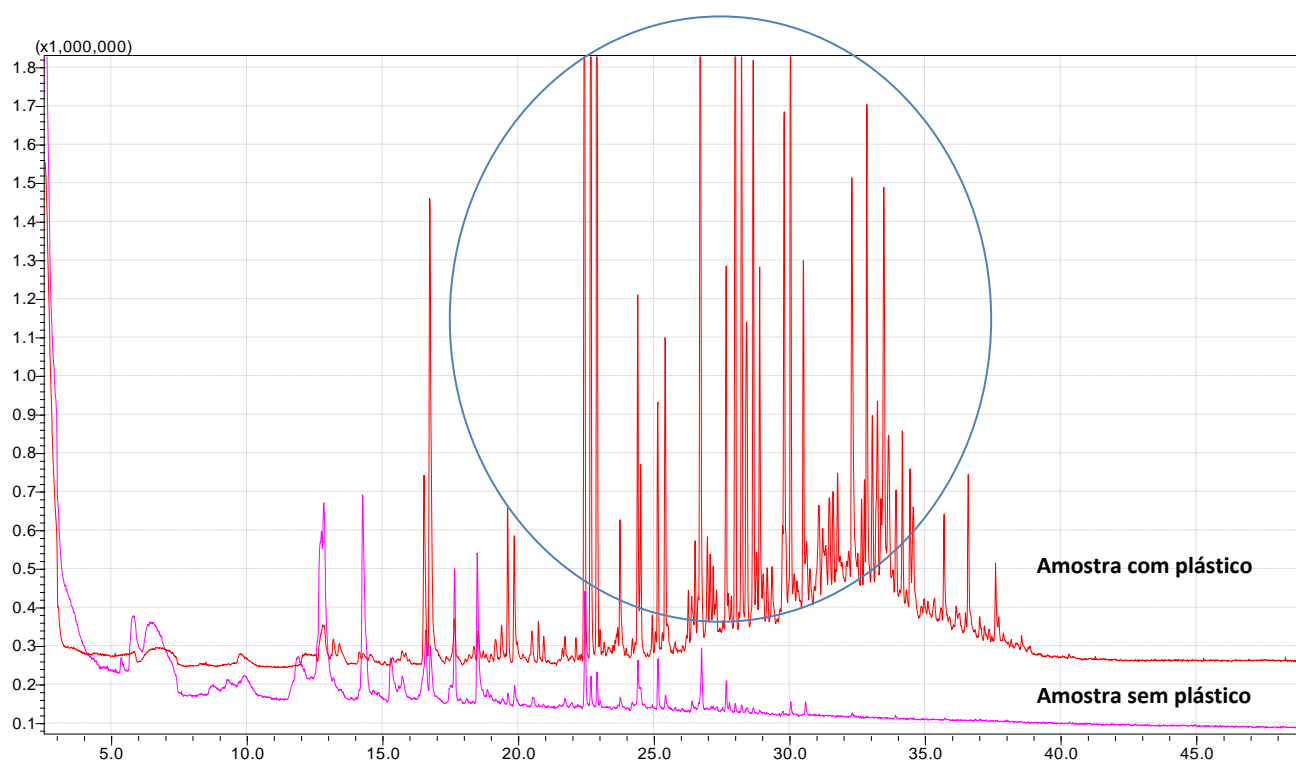


Figura 29: Sobreposição dos perfis cromatográficos obtidos por GC/MS para a amostra com plástico e amostra sem plástico

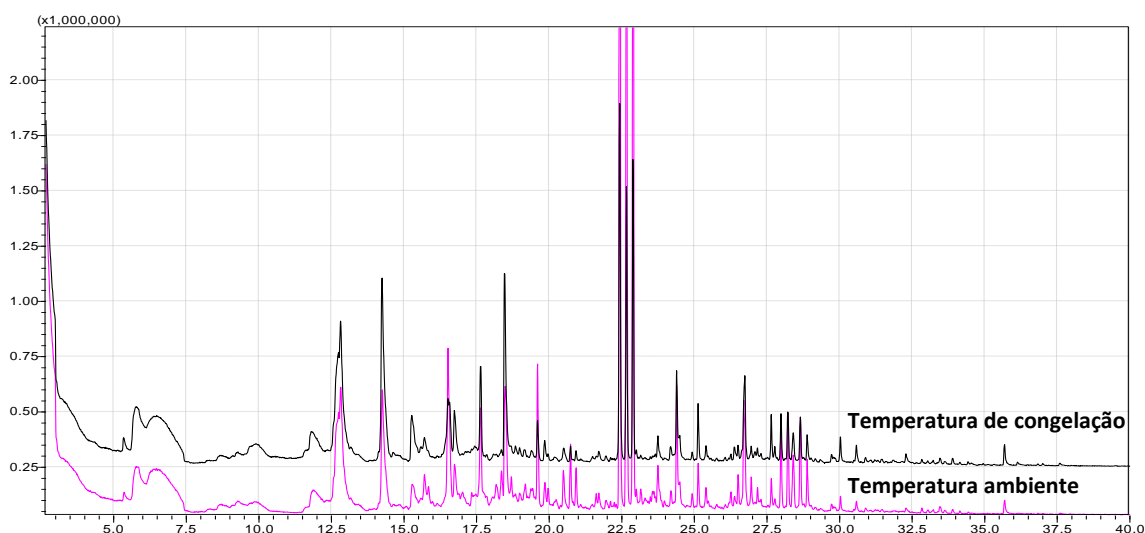


Figura 30: Sobreposição dos perfis cromatográficos para armazenada em plástico à temperatura ambiente e armazenada em plástico à temperatura de -20°C

Os resultados mostram que as amostras poderiam estar contaminadas pelo plástico da embalagem e essa contaminação é notória para tempos de retenção mais elevados (> 25min). Foi também realizado um ensaio aquecendo o plástico utilizado na embalagem das amostras e os resultados vieram a confirmar a suspeita de contaminação. Para futuras amostragens as amostras deverão ser guardadas em frascos de vidro.

Verificou-se que a temperatura pode influenciar a contaminação, uma vez que a amostra armazenada à temperatura ambiente em embalagem de plástico apresenta picos com maior área no que no caso em que foi armazenada no congelador.

Em face dos resultados obtidos, serão apenas considerados os compostos até aos 20 minutos de tempo de retenção e atendo a que os aldeídos são os compostos que contribuem maioritariamente aroma, estes serão os compostos considerados, nomeadamente o hexanal, heptanal, 2-heptanal, 2-octenal, nonanal, 2-nonenal (E) e decanal.

O hexanal surge referenciado na bibliografia como um dos contribuintes para o aroma a pipocas (Park & Maga, 2006). Este surge também mencionado como um dos compostos identificados em farinhas de milho que sofrem um processo de extrusão, bem como o heptanal, 2-heptanal (Z), 2-octenal, nonanal e o decanal. (Bredie, *et al.*,

1998). Estes compostos foram detetados em outros tipos de cereais, como de pequeno almoço (Klensporf & Jelén, 2005).

A identificação de compostos pela biblioteca de espectros não é suficiente para garantir a correta identificação do composto (Mondello, 2005). Assim, de forma a confirmar a identificação dos aldeídos em estudo, analisou-se uma solução padrão de alcanos C8-C20 (Figura 31) nas mesmas condições de análise das amostras. A partir do tempo de retenção de cada alcano foi possível calcular os índices de retenção de cada composto volátil da farinha de milho.

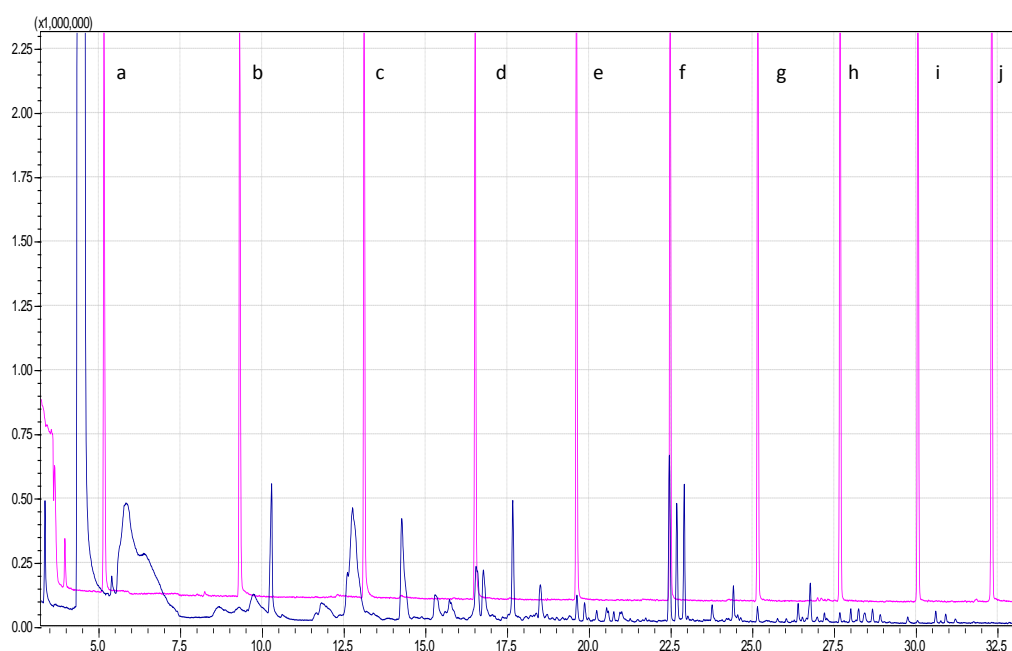


Figura 31: Sobreposição do perfil cromatográfico da **amostra 44** com o perfil cromatográfico obtido para a **mistura padrão C8-C20**.

Foi também necessário identificar os compostos presentes na mistura padrão bem como determinar os seus índices de retenção linear (Tabela 16).

Tabela 16: Identificação dos compostos da mistura padrão de hidrocarbonetos, com respectivo tempo de retenção e índice de retenção linear (LRI)

Pico	Composto	Tempo de retenção (min)	Índice de retenção
a	C8	5,155	800
b	C9	9,304	900
c	C10	13,111	1000
d	C11	16,506	1100
e	C12	19,607	1200
f	C13	22,472	1300
g	C14	25,151	1400
h	C15	27,670	1500
i	C16	30,051	1600
j	C17	32,307	1700

De entre os índices de retenção encontrados na literatura pode-se citar o índice Kováts e o índice de retenção linear (LRI) como sendo amplamente divulgados. O índice Kováts é sempre calculado sob condições isotérmicas de temperatura. Quando se utilizam temperaturas programadas de coluna, um valor similar pode ser calculado utilizando os números extraídos de seus algoritmos, sendo que este valor é chamado de índice de retenção linear– LRI (Inczyedy, *et al.*, 1998).

A partir da seguinte equação descrita na secção 3.3.2.6 foi possível calcular o índice de retenção linear (LRI) de cada composto (Viegas & Bassoli, 2007).

Para auxiliar na identificação e caracterização dos compostos voláteis, os valores de índice de retenção linear calculados foram comparados com valores encontrados na literatura (www.pherobase.com) para colunas de mesma polaridade, atendendo que a coluna usada é uma DB- 5MS.

A utilização dos valores de índice de retenção linear (LRI) aumentou a confiança das identificações obtidas pela biblioteca de espectros (Figuras e a j, Anexo II).

A Tabela 17 apresenta os cálculos de LRI efetuados para os compostos de interesse, de forma a tentar identificá-los, por comparação com o LRI de referência.

Tabela 17: Compostos voláteis possivelmente identificados em GC/MS e identificados pela biblioteca de espectros de massa e LRI

Nº pico	Tempo de retenção (min)	Composto	LRI Obtido	LRI Referência (www.pherobase.com)	Biblioteca
1	5,826	Hexanal	816	819	NIST21.LIB
3	9,731	Heptanal	911	900	WILEY 229.LIB
4	11,672	2-Heptenal	962	964	WILEY 229.LIB
7	16,758	Nonanal	1108	1104	WILEY 229.LIB
8	18,501	2- Nonenal (E)	1164	1162	WILEY 229.LIB
9	19,853	Decanal	1208	1204	WILEY 229.LIB

O hexanal, heptanal e decanal são conhecidos como resultantes da oxidação dos ácidos gordos polinsaturados que estão presentes nos alimentos ricos em gordura (Klensporf & Jelén, 2005). O conteúdo em hexanal aumenta durante o aquecimento (como se verificou nos resultados do processo de otimização) e armazenamento de farinhas (Moltenberg, *et al.*, 1996).

Considerando as áreas médias dos compostos descritos na Tabela 17 foi possível comparar as amostras em termos de compostos voláteis. Assim, analisando a Figura 32 conclui-se que a amostra que apresenta maior teor em aldeídos, comparativamente às restantes, é a amostra 11, seguindo-se a amostra 35. Sabe-se que a amostra 11 corresponde a uma variedade tradicional de milho (Broa 92), com cor branca e cedida por um agricultor de Viseu, da Boa Aldeia. Quanto à amostra 35, designada de BS22, esta provem de uma população americana de milho, utilizada como standard internacional para comparação com as amostras nacionais e apresenta coloração amarela. Esta amostra é utilizada como padrão em termos de comparação entre as variedades portuguesas e americanas, visto ser uma amostra amplamente estudada e conhecida.

Por sua vez, a amostra que apresenta menor área é a amostra 39 que corresponde a uma variedade da região centro, a variedade “Broa 218”, com coloração amarela.

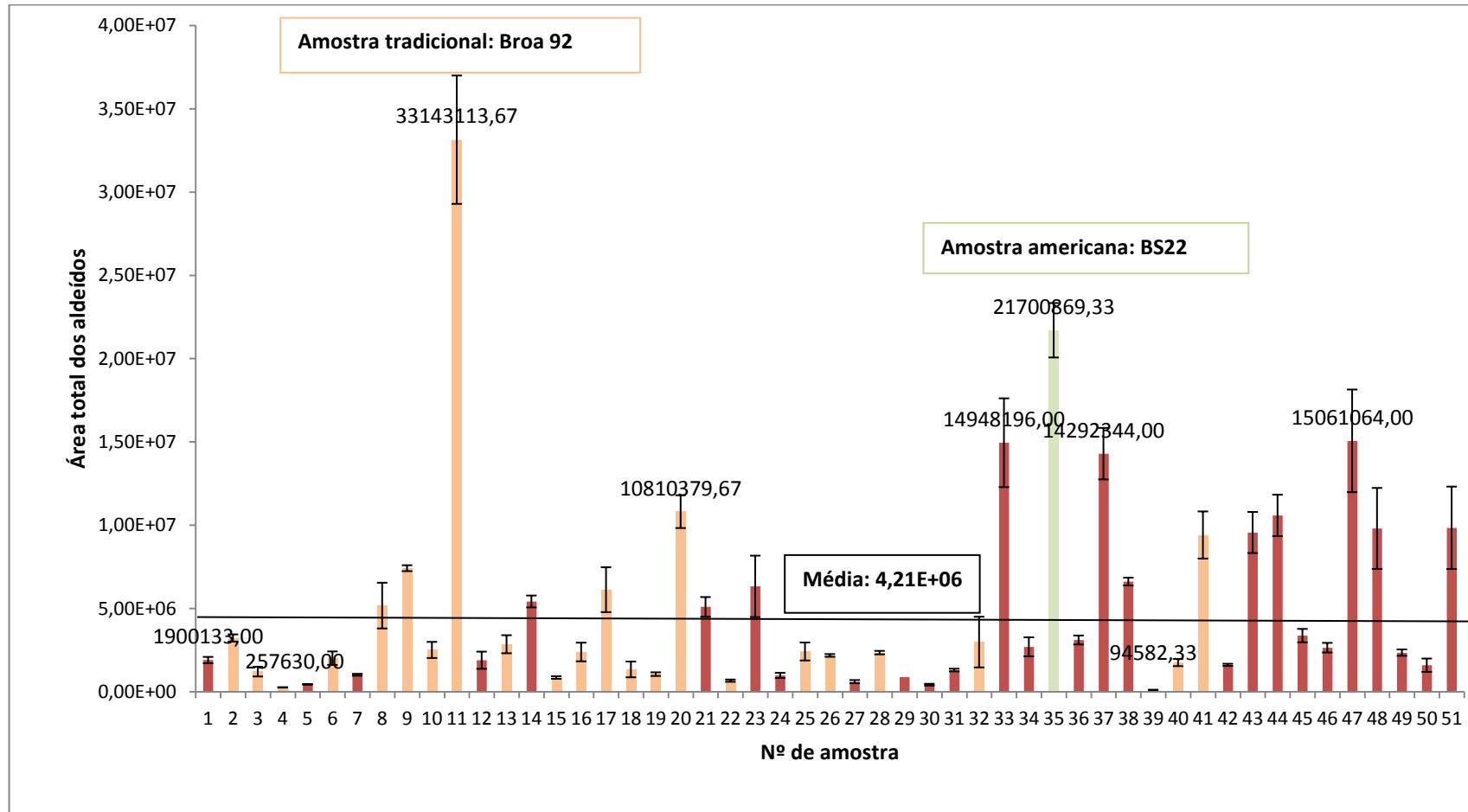


Figura 32: Área média obtida para os aldeídos identificados em cada variedade milho analisada

No gráfico surgem destacadas duas variedades: uma variedade tradicional portuguesa, a “Broa 92” e a variedade americana “BS22”, usada com o intuito de comparar variedades portuguesas com uma variedade não portuguesa e internacionalmente conhecida. Verifica-se então que a amostra tradicional “Broa 92” apresenta maior teor em aldeídos do que a amostra de referência “BS22” que por sua vez se encontra acima do valor médio obtido para as 51 amostras. A variedade “Broa 92” também se destaca bastante das restantes variedades designadas de “broa”, que se encontram no gráfico com preenchimento a cor de laranja.

Por sua vez agruparam-se as amostras por cor tal como se pode ver na Figura 33.

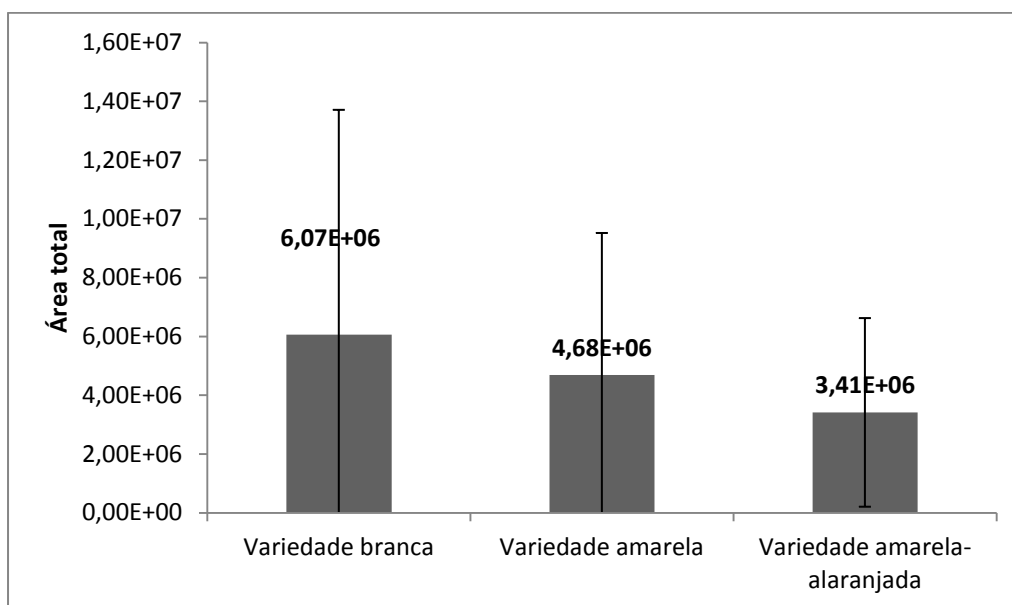


Figura 33: Áreas médias do total de aldeídos nas diferentes variedades de milho em termos de cor: variedade branca (n=24), variedade amarela (n=24), variedade amarela-alaranjada (n=3)

No entanto, não existem diferenças significativas na área total dos aldeídos, entre as diversas variedades de milho, fazendo o seu agrupamento pela cor. Outros fatores, que não a cor, como a variedade, o genótipo ou a proveniência estão com certeza a condicionar a composição em componentes volatéis.

4.2 Análise dos compostos fenólicos nas amostras de farinha de milho

4.2.1 Otimização do processo de extração de compostos fenólicos totais

Com vista à análise dos compostos fenólicos, procedeu-se à otimização do método de extração. O procedimento experimental final utilizado está descrito em 3.3.1. Após quantificação dos fenóis totais e análise por HPLC, verificou-se que as quantidades utilizadas eram adequadas para a quantificação do teor em fenóis totais pela técnica de Folin (Tabela 18) mas no entanto, na análise da amostra por HPLC observou-se que os picos eram muitos pequenos. Como tal, utilizaram-se 2g de farinha de milho e 20mL de solução extratante (EtOH/H₂O 50% (v/v)), de forma a obter

O teor em fenóis totais (FT) foi avaliado pela técnica de Folin, no entanto para analisar os compostos individualmente as técnicas separativas como a cromatografia de alta eficiência (HPLC) devem ser usadas (Mira, *et al.*, 2008; Mora Rochin, *et al.*, 2010).

O reagente de Folin-Ciocalteu reage com compostos fenólicos e aquando da reação entre o reagente e as espécies redutoras, verifica-se uma mudança de cor de amarelo para azul, que é medida a 750nm.

A Tabela 18 corresponde à concentração de FT obtida para a farinha de milho comercial, respeitante às condições inicialmente usadas no processo de extração de compostos fenólicos, utilizando 20mg de farinha. Para quantificar os compostos fenólicos totais foi necessária a elaboração de uma reta de calibração obtida com um composto fenólico, o ácido gálico como padrão (Figura 34).

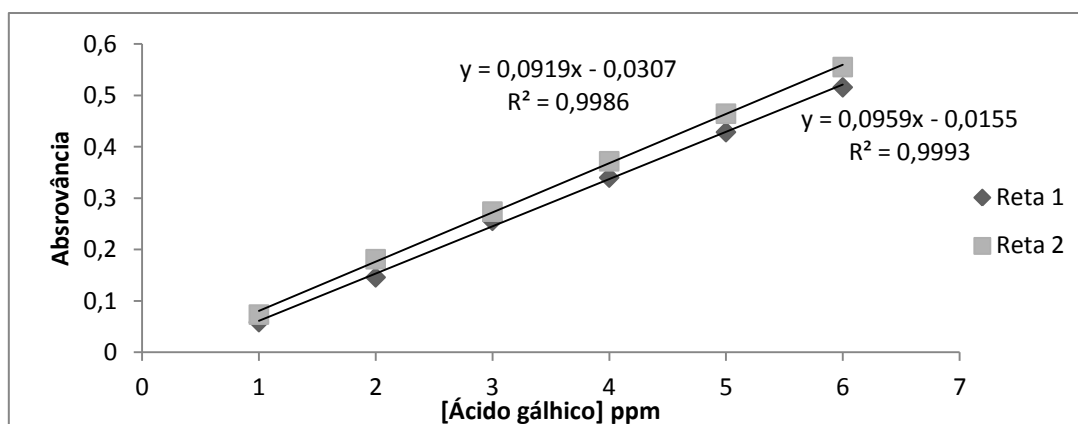


Figura 34: Reta de calibração do padrão ácido gálico. Medições feitas a 725nm e em 2 dias

Tabela 18: Concentração de compostos fenólicos no extrato de farinha comercial para 20mg de amostra

Amostra	Abs	[] (ppm AG extrato)	[](mg eq AG/100g amostra)
Farinha comercial	0,3089	3,69	184,5

A partir destes resultados conclui-se que as condições inicialmente utilizadas eram passíveis de serem utilizadas, uma vez que a concentração obtida, se encontra dentro da gama de valores de absorção da reta de calibração (1-6 ppm). Este extrato foi também analisado por HPLC-DAD, de forma a concluir se este permitia obter um cromatograma com picos com uma intensidade adequada a uma fácil deteção e identificação.

Analisando os perfis cromatográficos (Figura 35), e tal como já foi referido, verificou-se que o extrato tinha uma baixa concentração. As concentrações médias de fenóis totais obtidas para os diferentes extratantes encontram-se na Figura 36. Seguiu-se o procedimento descrito em 3.3.2 e a partir da equação da reta 1 obtiveram-se as respetivas concentrações em fenóis totais da amostra para cada extratante testado (Tabela a, Anexo III).

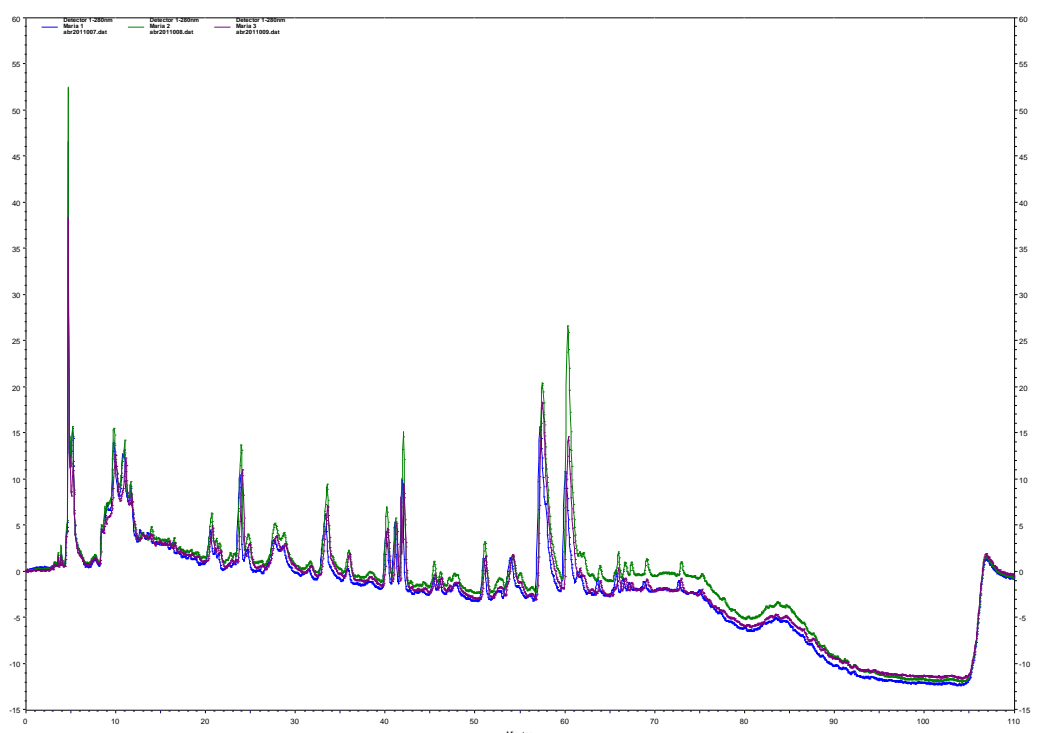


Figura 35: Perfis cromatográficos obtidos por HPLC-DAD a 280nm para 20mg de farinha comercial com 10mL de EtOH/H₂O (50:50) (n=3)

Os resultados representados na Figura 36 mostram que o melhor solvente para extração de polifenóis totais na farinha de milho é a mistura de EtOH/H₂O (50:50 v/v), visto ser com este solvente que se obtém maior concentração de fenóis e um DPr (2,95 %) menor comparativamente aos restantes extratantes.

O EtOH é melhor solvente que a acetona, devido à sua polaridade o que determina uma maior solubilidade para compostos fenólicos (Siddhuraju&Becker, 2003; Zhou&Yu, 2004). Em face dos resultados obtidos, o extratante que foi usado na comparação das amostras foi a mistura de EtOH/H₂O (50:50 v/v).

Lopez Martinez, *et al.*, (2009) para extração de compostos fenólicos em milho mexicano também usaram o mesmo tipo de mistura de solventes, mas com 80% de EtOH em vez de 50%. Num estudo feito por Luthria, (2008) para a extração de compostos fenólicos em salvia também foi utilizada a mistura de solventes, EtOH/H₂O (50:50 v/v), bem como acetona/H₂O (50:50 v/v).

Os extratos obtidos foram analisados por HPLC-DAD-ED de forma a verificar a intensidade dos picos cromatográficos para cada extratante. Na Figura 37 apresentam-

se os perfis cromatográficos obtidos para cada extrato, tendo sido escolhido um de cada triplicado analisado. Os extratos analisados, foram preparados nas condições descritas em 3.3.1 (20mg de farinha/10mL de solução extratante).

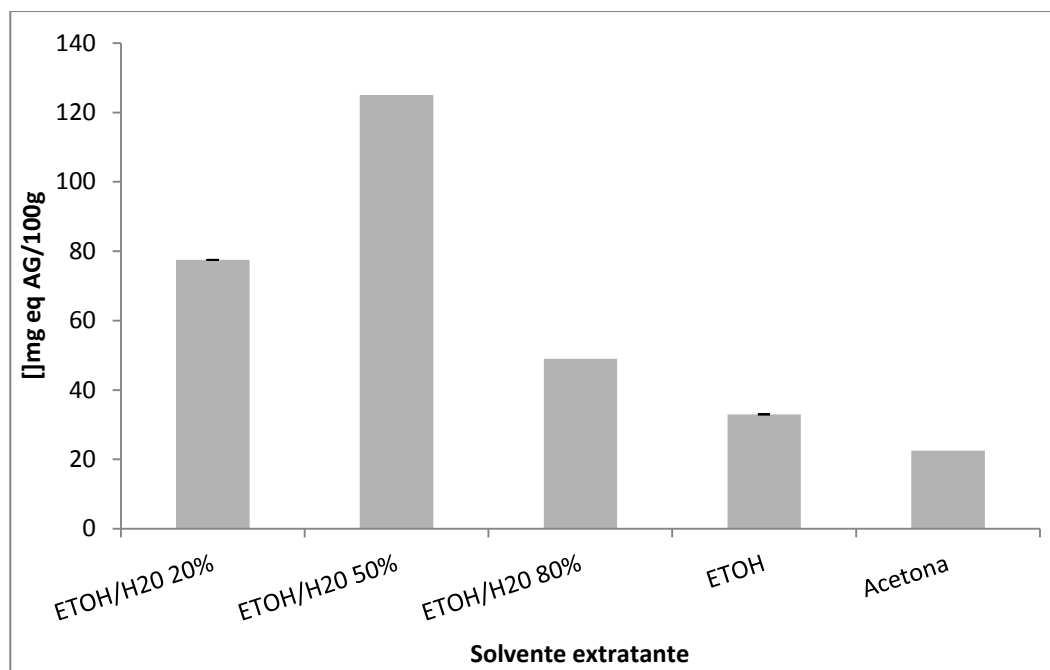


Figura 36: Concentração de fenóis totais extraídos da farinha com os diferentes solventes extratantes e respetivo desvio padrão (n=3)

Os cromatogramas a 280nm da Figura 37 mostram que se obteve um melhor perfil (com mais picos, melhor definidos e com maior intensidade) com o solvente EtOH/H₂O 50% como já se tinha referido. O pico maior que se observa no cromatograma a eluir cerca dos 10 minutos, corresponde ao pico da acetona, que poderá estar sobreposto a outros compostos que estão presentes naquele tempo de retenção. Atendendo aos perfis cromatográficos obtidos para o EtOH a 280nm verifica-se que até cerca de 50 minutos os perfis obtidos para o EtOH a 20% e 50% são muito semelhantes, com picos com elevada intensidade. Para este mesmo tempo verifica-se a ausência de alguns picos entre 10 e 20 minutos no perfil obtido com EtOH a 80%, solvente este que favorece os compostos a partir dos 50 minutos de eluição. Atendendo a estas diferenças, justifica-se a escolha do EtOH a 50%, visto ser o que

apresenta o perfil que apresenta todos os compostos que estão presentes no extrato de EtOH 20% e 80%.

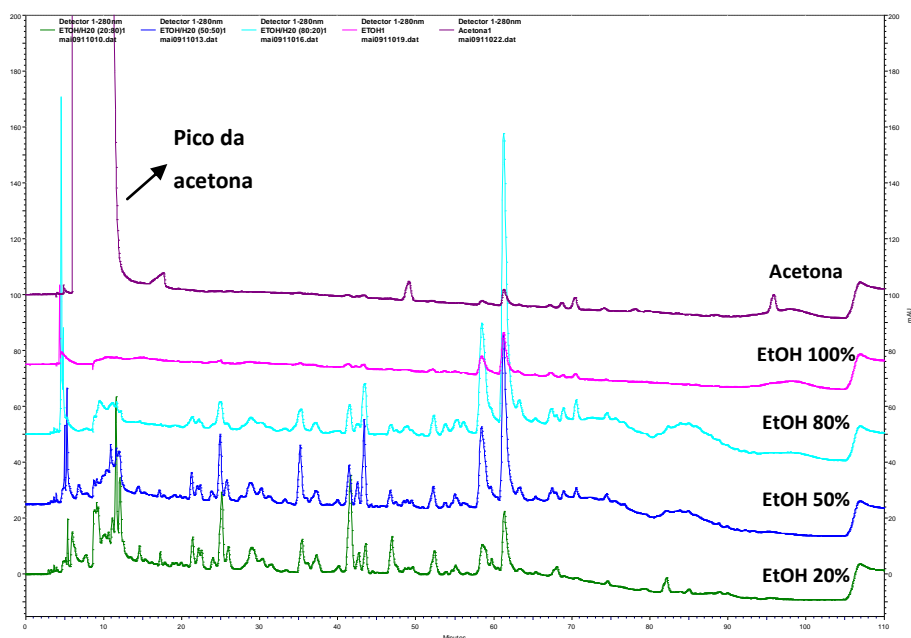


Figura 37: Comparação dos cromatogramas a 280nm obtidos para o extrato de farinha de milho preparado com diferentes extratantes

Analisando todos os perfis cromatográficos a diferentes c.d.o (280nm, 320nm e 360nm) para os mesmos solventes (Figura 37, Figura 38 e Figura 39) de forma a verificar se alguma família de compostos é favorecida por diferentes extratantes, verifica-se de uma forma geral que para tempos compreendidos entre 60 e 70 minutos, os compostos surgem com maior intensidade com a extração com EtOH a 80%, por apresentarem maior afinidade para o EtOH do que para a água. Para tempos de retenção menores os compostos parecem ter mais afinidade para água, surgindo com maior intensidade para os solventes com menor quantidade de EtOH.

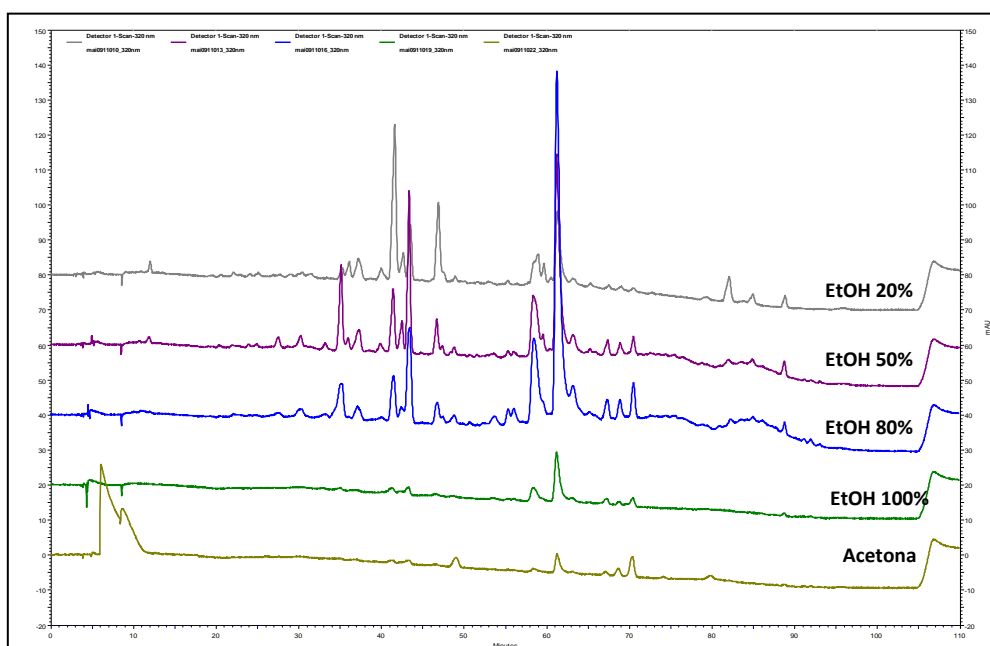


Figura 38: Comparação dos cromatogramas a 320nm obtidos para o extrato de farinha de milho preparado com diferentes extratantes

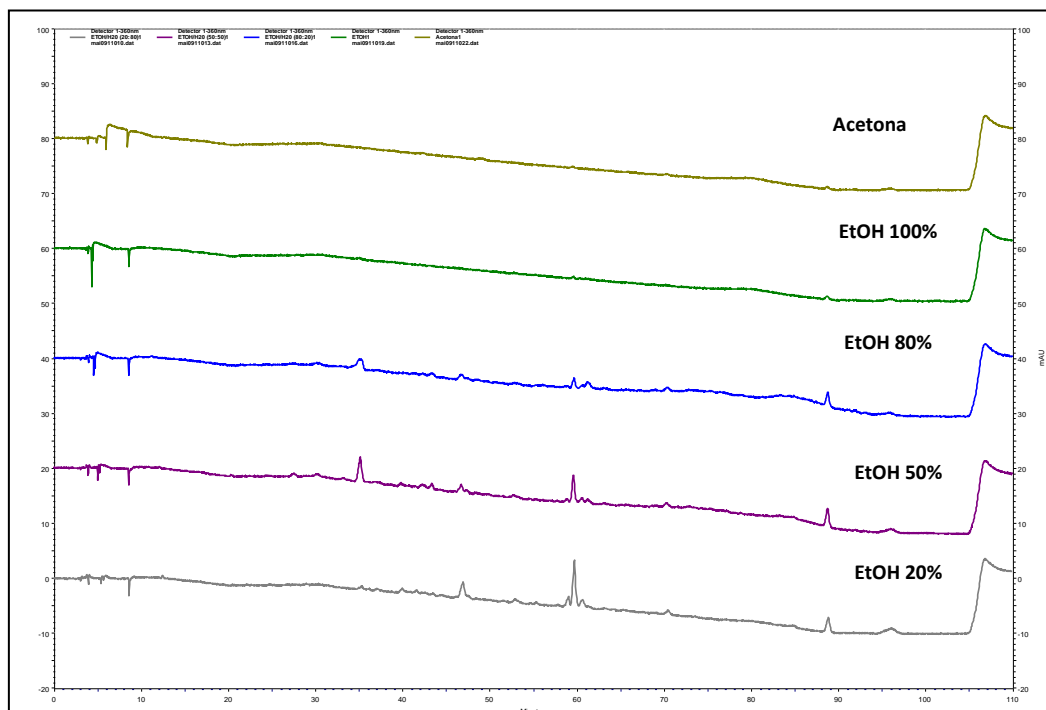


Figura 39: Comparação dos cromatogramas a 360nm obtidos para o extrato de farinha de milho preparado com diferentes extratantes

Testou-se também o fator de concentração das amostras, para tal evaporou-se o solvente na amostra e redissolveu-se o precipitado com 0,5 mL do solvente extratante (EtOH/H₂O 80%) que foi analisado por HPLC. O extrato concentrado que se obteve apresentava picos com uma intensidade mais adequada à análise por HPLC (como se verifica no cromatograma da Figura 40, – EtOH/H₂O 80% conc).

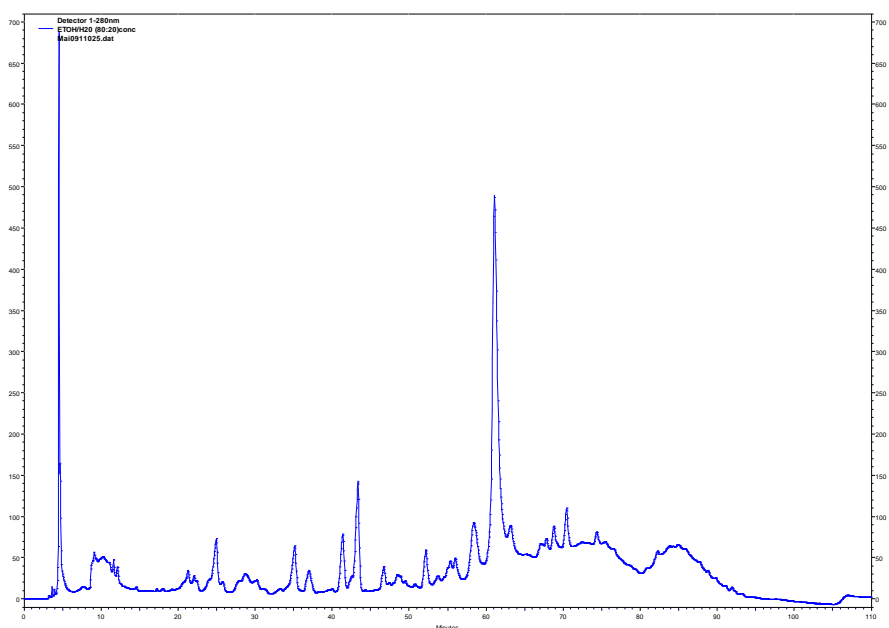


Figura 40: Perfil cromatográfico obtido para um extrato concentrado 20x de farinha comercial preparada em EtOH/H₂O (80%)

Atendendo a que o volume de solução extratante utilizado para a redissolução do conteúdo do balão era muito pouco e poderia ser insuficiente para total redissolução e após mais alguns ensaios, otimizou-se a relação massa de farinha: volume de solução extratante e o volume final de redissolução e usaram-se 2g de farinha, 20mL de solução extratante e um volume final de 1mL.

Avaliaram-se também dois métodos de análise por HPLC para compostos fenólicos, métodos esses já implementados no laboratório: o método I e o método II, cujas condições de análise foram descritas em 3.3.4.4.

O método I é um método de análise mais lento e logo, no caso de a amostra ter na sua composição compostos mais apolares, estes podem não eluir nestas condições. Como tal, deverá ser testado um método (método II) que utiliza maior % de

acetonitrilo e vai permitir a eluição dos componentes da amostra que sejam mais apolares (Figura 41).

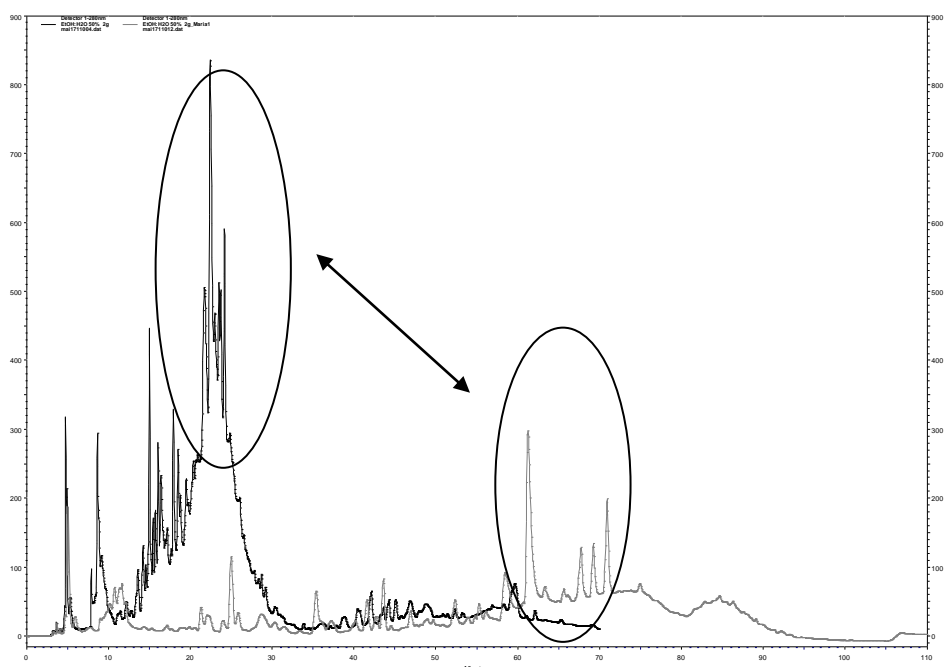


Figura 41: Sobreposição dos cromatogramas a 280nm obtidos com os dois programas de análise: **método I** e **método II**

Pode concluir-se que alguns compostos eluem com tempo de retenção maior ao do tempo de análise no método I, mas a sua área é relativamente pequena, pelo que para efeitos de comparação se vai usar o método I, em que a resolução é mais adequada. Para estudos futuros terá que ser avaliada a possibilidade de se utilizar um método intermédio que possibilite uma melhor resolução de todos os compostos mas em que sejam atingidas as % de acetonitrilo do método II.

Com o objetivo de se selecionar o comprimento de onda mais adequado para as amostras analisadas ao longo do trabalho, compararam-se os cromatogramas a diferentes c.d.o. da amostra comercial (Figura 42).

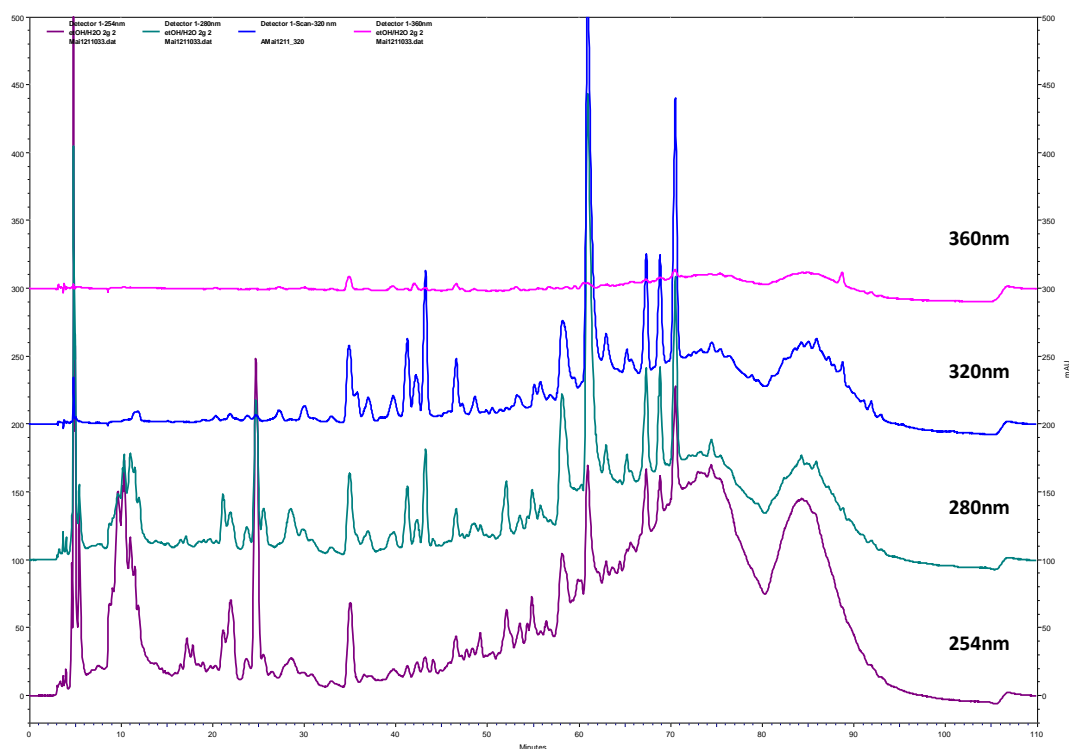


Figura 42: Perfis cromatográficos da amostra comercial nos diversos c.d.o. obtidos com o método de análise I

Os perfis cromatográficos mostram que para menores tempos de retenção são detetados compostos que apresentam maior absorção a 254 e a 280nm (comprimento de onda mais característico dos ácidos benzóicos e outros compostos fenólicos). Alguns compostos com maior tempo de retenção apresentam áreas mais elevadas a 320nm (comprimento de onda característico de absorção de ácidos cinâmicos), mas a 360nm praticamente não são detectados picos, o que significa que as amostras devem apresentar baixos teores de flavonóis.

Na Tabela 19 estão descritos alguns exemplos de compostos para cada família, bem como o c.d.o a que absorvem e na Figura 43 apresentam-se a título de exemplo alguns espectros de UV/Vis caraterísticos das famílias de compostos mencionadas.

Tabela 19: Família de compostos fenólicos e respectivos c.d.o. a que absorvem

C.d.o (nm)	Família de compostos	Exemplos de compostos
254	Ácidos benzóicos	Ác. vanílico, sirínico, salicílico, gálico e <i>p</i> -hidroxibenzoico
280	Fenóis em geral	Catequina
320	Ácidos cinâmicos	Ác. Clorogénico, cafeico, <i>p</i> -coumárico, ác. sinápico, ferúlico e cinâmico
360	Flavonóis	Quercetina

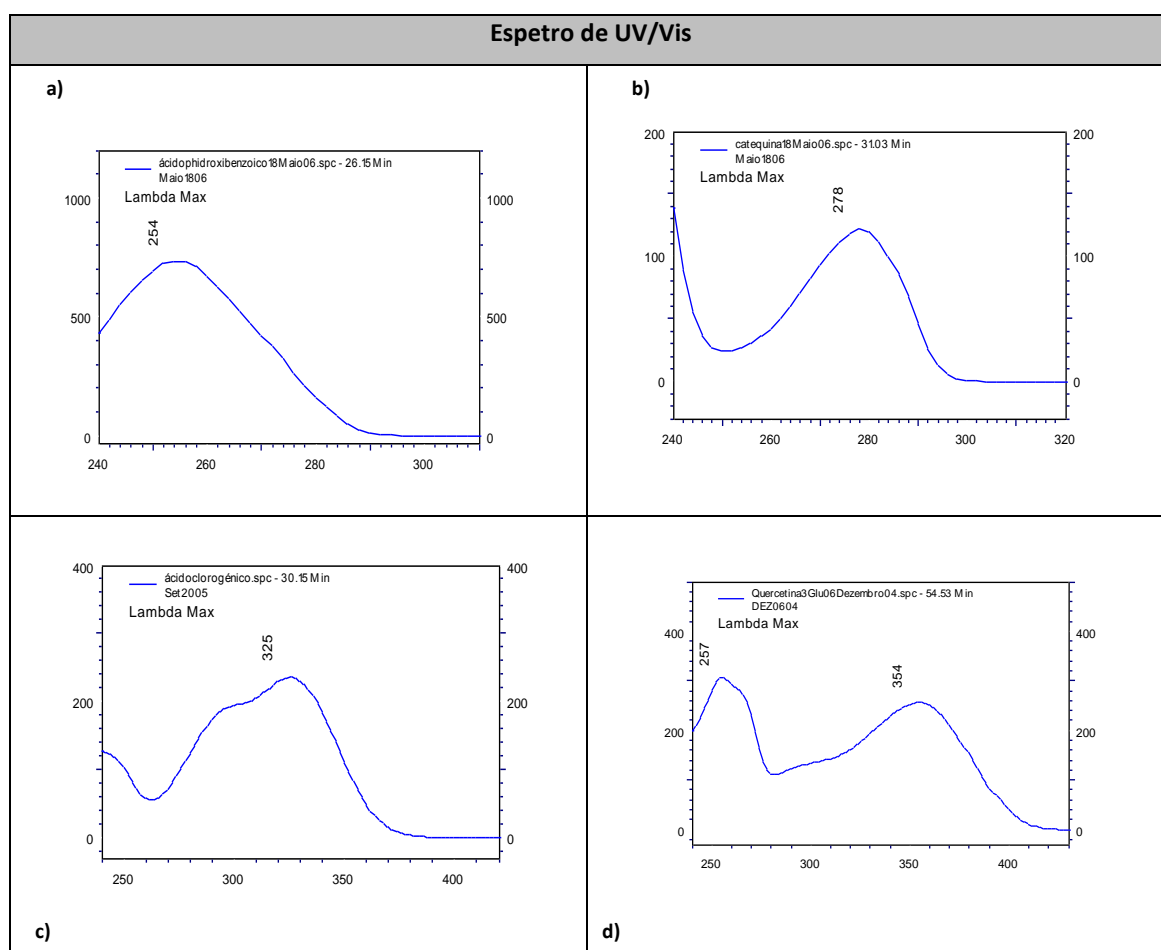


Figura 43: Espetros de UV/Vis retirados da biblioteca de espectros do *software* Chromquest para as seguintes família: a) ácido *p*-hidroxibenzoico, b) catequina, c) ácido clorogénico, d) quercetina 3 –glucósido

4.2.2 Análise das amostras de farinha de milho

Após otimização dos parâmetros mencionados anteriormente procedeu-se à análise das 51 amostras. Nestas amostras quantificaram-se compostos fenólicos totais e flavonóides totais utilizando um método espetofotométrico e por HPLC-DAD-ED. Identificaram-se e quantificaram-se alguns compostos fenólicos individuais por HPLC-DAD. Estas amostras foram também analisadas por HPLC-ED de forma a verificar quais os possíveis compostos com atividade antioxidante, a qual também foi determinada. Os vários resultados obtidos são comparados.

Realizaram-se também alguns ensaios preliminares por HPLC-MS/MS com vista a uma possível identificação de compostos fenólicos.

4.2.2.1 Quantificação dos compostos fenólicos totais por Folin Ciocalteu e por HPLC-DAD

Procedeu-se à quantificação de fenóis totais nas amostras de farinha de milho pelo método de Folin Ciocalteu. Realizaram-se retas de calibração (1-6ppm), sempre que se faziam determinações de amostras, de forma a verificar a variação dos parâmetros da reta de calibração. As várias retas de calibração usadas estão apresentadas na Figura 44.

De forma a controlar os resultados obtidos por espectrofotometria realizaram-se cartas de controlo, uma para cada parâmetro das retas de calibração de ácido gálgico, realizadas em dias diferentes. As cartas são apresentadas na Figura 45 a Figura 47.

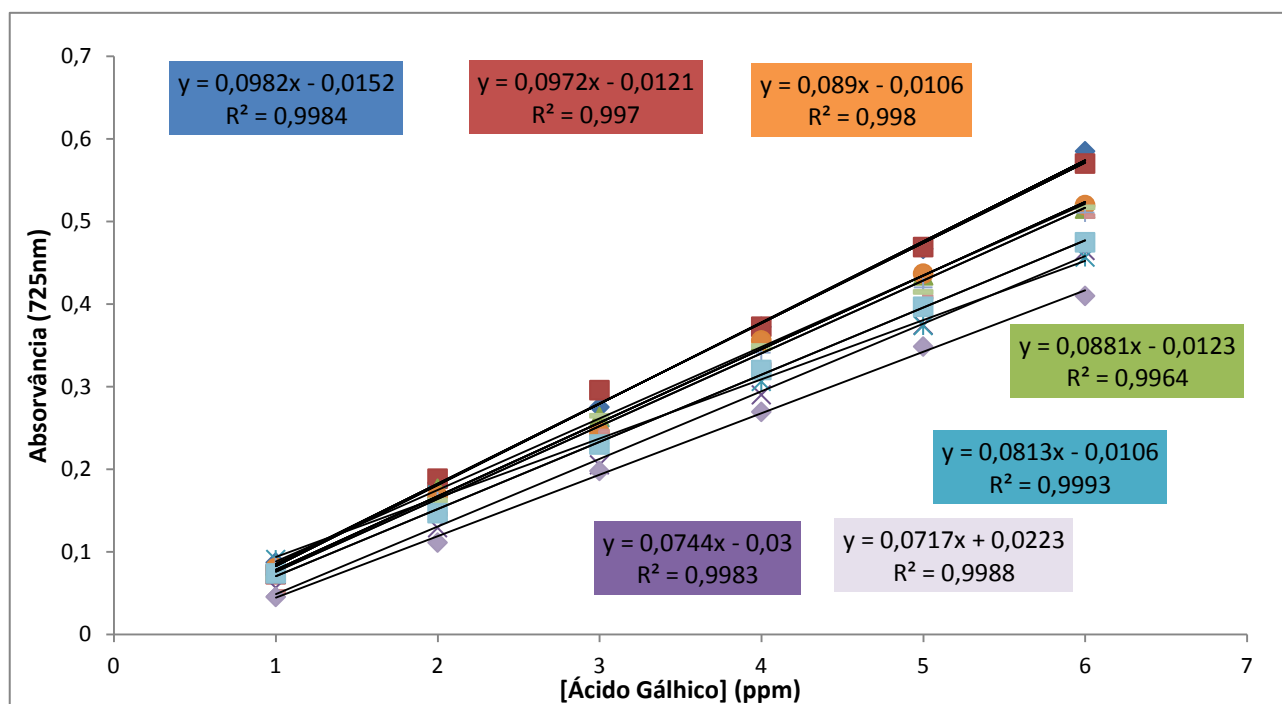


Figura 44: Retas de ácido gálico utilizadas para quantificar fenóis totais, traçadas em dias diferentes

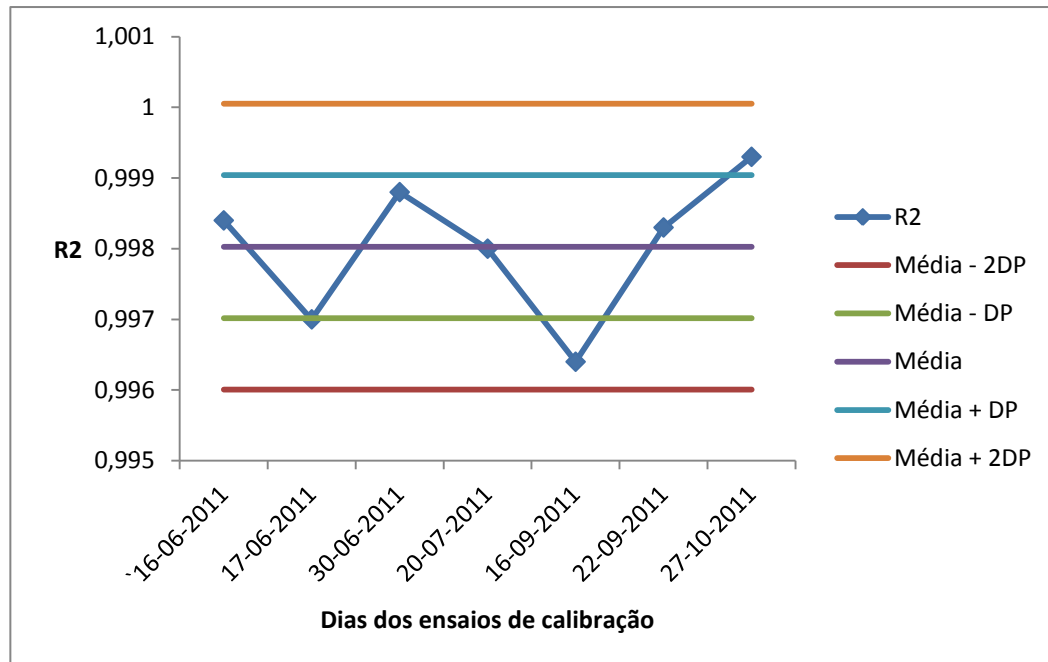


Figura 45: Carta de controlo para o coeficiente de determinação (R^2) obtido para os diferentes dias de ensaios de calibração

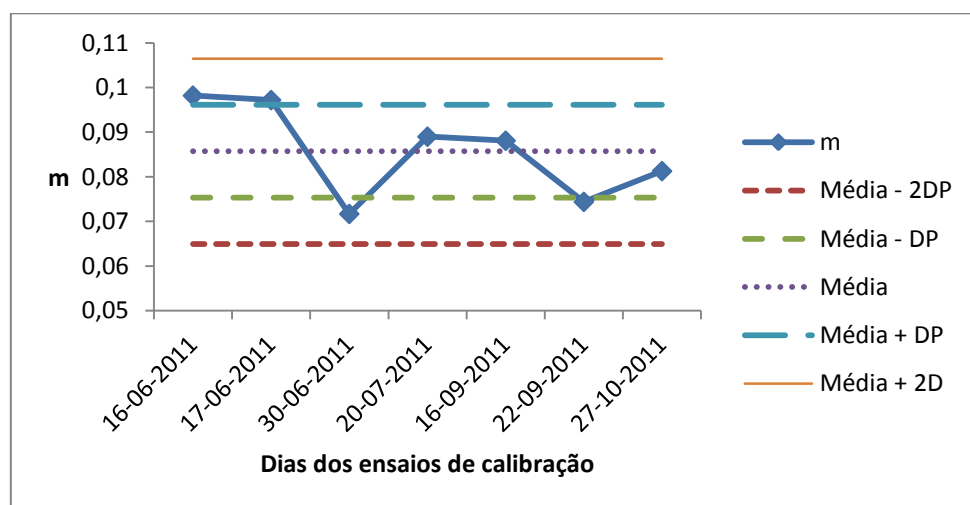


Figura 46: Carta de controlo para o declive (m) obtido para os diferentes dias de ensaios de calibração

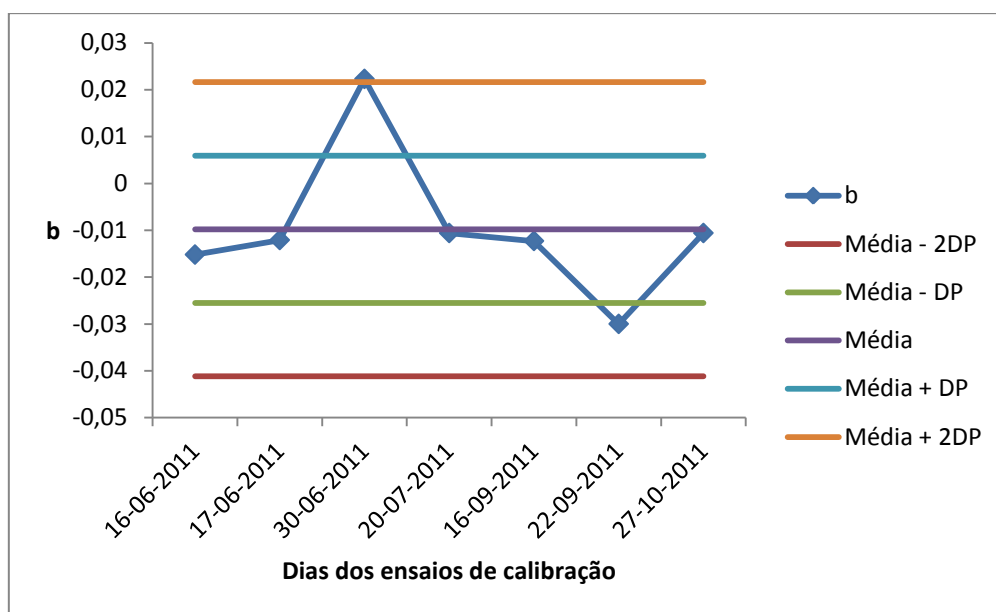


Figura 47: Carta de controlo para a ordenada na origem (b) obtida para os diferentes dias de ensaios de calibração

Por análise das cartas de controlo das retas de calibração de ácido gálico utilizadas, verifica-se que todos os parâmetros se encontram dentro dos desvios esperados para as variáveis aleatórias decorridas nos diferentes dias dos ensaios de calibração.

A partir dos valores de absorvâncias lidas no espectrofotômetro a 725 nm após reação com o Folin-Ciocalteu e utilizando a reta de calibração do ácido gálico foi possível calcular o teor em fenóis totais nas amostras. Os resultados foram obtidos em triplicado (Tabela b, Anexo III) e determinou-se para cada amostra a concentração média de fenóis totais, o DP e o DPr (%). Os resultados relativos ao teor de compostos fenólicos totais foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (AG)/100g de peso seco (p.s.), atendo a que a percentagem média de humidade das amostras era de 9% (o mesmo fator foi aplicado nos restantes resultados). O teor de humidade foi determinado na farinha de milho, segundo a NP 4399:2000, por outra equipa participante no projeto.

Por sua vez, procedeu-se também à quantificação de fenóis totais por HPLC-DAD e para a análise dos extratos para esta técnica, foi necessário concentrar os extratos. Considerando que o volume inicial de extrato era 20mL e que após concentração o volume final era de 1mL, o fator de concentração seria de 20. No entanto, de forma a verificar se realmente era este o fator de concentração obtido para os extratos realizaram-se alguns ensaios (Experiências 1, 2 3 e 4 descritas na secção 3.3.4.5), também de forma a observar o que ocorre ao longo de processo de concentração que possa influenciar o fator de concentração final.

Atendendo também à utilização das duas técnicas para quantificação do teor de fenóis totais, estes ensaios também tiveram como objetivo estudar diferentes fatores que pudessem explicar diferenças nos resultados obtidos para ambos os métodos de quantificação.

Na Tabela 20 foram sumarizados os resultados obtidos nas diferentes experiências (1, 2, 3 e 4) após análise espectrofotométrica pela técnica de Folin-Ciocalteu, utilizando uma reta de calibração de ácido gálico para quantificação de fenóis totais (Tabela c, figura a, Anexo III). Succintamente, a experiência 1 tinha como objetivo determinar o teor de fenóis totais em diversos extratos concentrados consecutivamente (Extrato 1, Extrato 2, Extrato 3), de forma a verificar de que forma o fator de concentração influencia este teor. Determinou-se o teor de fenóis totais a 280nm por HPLC-DAD, a partir das áreas totais dos cromatogramas apresentados na Figura 48 e com base na reta de calibração de ácido gálico (Tabela d, figura b, Anexo

III). O teor de fenóis totais nos diferentes extratos, são apresentados na (Tabela 21), comparando-se os teores de fenóis totais determinados pelo método de Folin e por HPLC-DAD.

A experiência 2, consistiu em verificar a influência da redissolução do extrato concentrado dentro e fora do balão onde foi concentrado. Com o intuito, de verificar o teor de fenóis totais no “bolo” resultante da filtração foi realizada a experiência 3 e por fim a experiência 4, objetivou o estudo da interferência do tamanho do poro do filtro, na filtração dos extratos.

Tabela 20: Teor de fenóis totais pela técnica de Folin-Ciocalteu obtidos para as diversas experiências

<u>Experiência 1</u>	[]mg eq AG/ 100g p.s. amostra
Extrato original (Amostra 35)	161,31±1,39
Extrato 1	131,12±0,33
Extrato 2	92,18±3,73
Extrato 3	95,91±0,28
<u>Experiência 2</u>	
Redissolução dentro balão	98,49±3,77
Redissolução fora do balão	23,52±1,73
<u>Experiência 3</u>	
Extrato original (A35)	221,64±1,05
Lavagem do “bolo”	96,63±0,59
<u>Experiência 4</u>	
Amostra 47 não filtrada	117,23±2,73
Amostra 47 filtrada com.filtro 0.45µm	112,28±1,00
Amostra 47 filtrada com filtro 0.22 µm	106,24±5,09
Global	Média±DP

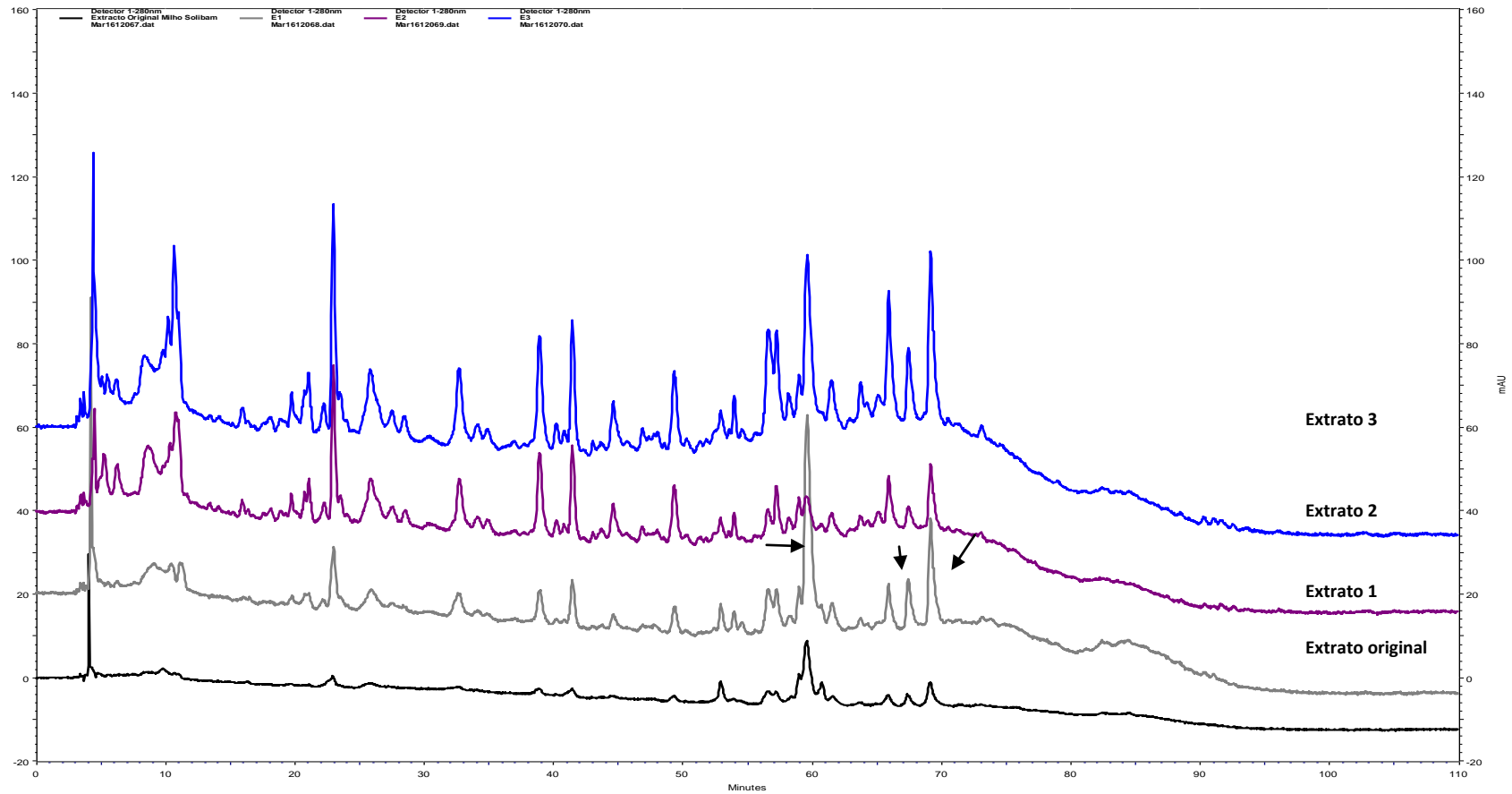


Figura 48: Sobreposição dos perfis cromatográficos obtidos por HPLD-DAD a 280nm de um extrato de farinha de milho nas diversas concentrações da experiência 1

Tabela 21: Teor de fenóis totais nos diferentes extratos da experiência 1, obtidos por espectrofotometria (Folin-Ciocalteu) e por HPLC-DAD-ED

Amostras	Fenóis totais	Fenóis totais
	Folin-Ciocalteu (mg eq AG/100g amostra p.s.)	HPLC-DAD-ED (mg eq AG/100g amostra p.s.)
Extrato original	161,31	78,93
Extrato 1	131,12	65,01
Extrato 2	92,18	44,26
Extrato 3	95,91	41,88

Por análise da Tabela 20, em relação à 1ª experiência, que corresponde à medição do teor fenóis tanto espectofotometricamente como por HPLC, nas diversas frações concentradas consecutivamente, verificou-se que à medida que o extrato original é concentrado o teor em fenóis totais vai diminuindo tanto pela técnica de Folin como por HPLC (Tabela 21). No entanto, os valores obtidos por ambas as técnicas são relativamente semelhantes em valor absoluto, uma vez que por ambas as técnicas existem perdas no teor de fenóis totais de cerca de 40% e 47%, para o método de Folin e por HPLC-DAD, respetivamente. Os valores mais elevados obtidos para o método de Folin, podem ser explicados devido à presença de outros compostos, que não os compostos fenólicos, que interagem com o reagente de Folin e não absorvem a 280nm, não sendo quantificados a este comprimento de onda.

Por sua vez, por análise da Figura 48, verifica-se que o passo de concentração permite obter perfis cromatográficos com picos mais definidos e que de uma forma geral existem compostos que são influenciados pela concentração, ou seja, à medida que a concentração aumenta, os picos aumentam, salvo os compostos que se observam cerca dos 60, 66 e 69 minutos. Para estes comportos observa-se um decréscimo do extrato 1 para o extrato 2, significando que estes não se comportam da mesma forma que os restantes e deverão ser considerados como compostos desviantes que podem provocar alterações nos resultados. Estes compostos

apresentam máximos de absorção compreendidos entre 290 e 320nm, parecendo ser ácidos cinâmicos (Tabela e, Anexo III).

Com a experiência 1, conclui-se então, que existem perdas de compostos fenólicos com a concentração, estas perdas podem ser explicadas atendendo à afinidade dos compostos para o EtOH (da solução extratante EtOH/H₂O 50%), que no passo de concentração no evaporador rotativo, evapora primeiro que a água, provocando eventualmente a sua precipitação. Estes resultados observados, podem explicar também as variações encontradas na quantificação de fenóis totais nas amostras em estudo pelos dois métodos de quantificação, visto que para o método de Folin não se utilizaram os extratos concentrados, mas estes foram usados para a quantificação por HPLC-DAD, o que poderá provocar interferências nos resultados.

No futuro deverão ser feitas novas experiências em que os extratos concentrados também são analisados pelo método de Folin e os resultados comparados. Assim, tendo em conta que existe um decréscimo de cerca de 47% no teor de fenóis totais, o fator de concentração para os extratos utilizados para a análise por HPLC-DAD, foram então concentrados cerca de 10 vezes e não 20 como se supunha inicialmente. Em ensaios futuros deverá ser avaliado o fator de concentração a efetuar ao extrato.

Nomeadamente em relação à experiência 2, que consistiu em verificar se a redissolução do conteúdo existente no balão, após o passo de concentração, poderia ter influência nos resultados, observou-se que nem sempre a redissolução é total, ocorrendo perdas de matéria que pode ficar agarrada às paredes do balão. Ao efetuar a “redissolução fora do balão”, retirou-se inicialmente o conteúdo concentrado para um balão volumétrico e o restante que se encontrava agarrado às paredes do balão foi redissolvido e obteve-se um valor de 23,52 mg eq AG/100g p.s. Este fato, pode ser uma das explicações apresentadas no decréscimo do valor dos fenóis totais, aquando da concentração do extrato original. A adição de esferas de vidro poderá ser útil para ajudar a redissolver o que estiver agarrado às paredes do balão.

Os resultados obtidos na experiência 3, mostram que o “bolo” resultante da filtração deverá ser sempre lavado com o extratante, uma vez que este ainda retém

uma quantidade significativa de teor de fenóis totais (87,92 mg eq AG/100g de amostra).

Relativamente à experiência 4 e de acordo com a tabela da Anova (Tabela 22) verificou-se que não existem diferenças significativas entre filtrar o extrato com filtro de 0,22 e 0,45µm e não filtrar.

Tabela 22:. Análise estatística pelo teste da Anova (fator único)

SUMÁRIO						
<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
Sem filtração	2	213,3333	106,6667	6,15574		
Filtros 0.45µm	2	204,3275	102,1637	0,827605		
Filtros 0.22µm	2	193,3333	96,66667	21,44933		

ANOVA						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	100,3294	2	50,16472	5,293	0,103763	9,552094
Dentro de grupos	28,43268	3	9,47756			
Total	128,7621	5				

A Tabela 23 sistematiza a concentração de fenóis totais para as amostras, obtida pelo método de Folin Ciocalteu e por HPLC-DAD e a partir destes valores e elaborou-se um gráfico de dispersão que relaciona os valores obtidos para ambas as técnicas de quantificação (Figura 50).

A quantificação dos fenóis totais das 51 amostras em estudo, por HPLC-DAD foi feita a partir das áreas totais obtidas a 280nm. Cada amostra foi analisada em triplicado (salvo algumas exceções em que a quantidade de amostra não foi suficiente) e para cada uma determinou-se a média das áreas totais, o DP e o DPr (%) (Tabela f, Anexo III). A partir de uma reta de ácido gálico (5-80ppm) por HPLC-DAD, foram quantificados os teores em fenóis totais (reta em Figura c, Tabela g Anexo III). Na determinação a partir do cromatograma foi considerada a integração de todo o cromatograma, considerando uma linha de base do tempo 0 ao tempo 110 minutos.

Tabela 23: Teores médios de fenóis totais (mg eq AG/100g p.s.) para cada amostra, obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu e por HPLC-DAD

Amostra	Folin-Ciocalteu	HPLC-DAD	Folin Ciocalteu/HPLC
	Teor médio de fenóis totais (mg AG/100g p.s.)	Teor médio de fenóis totais (mg AG/100g p.s.)	
1	190,45±4,62	123,96±13,56	1,54
2	140,03±2,19	145,91±13,98	0,96
3	206,83±9,55	131,85±20,06	1,57
4	188,83±7,17	144,70±36,15	1,30
5	136,83±2,37	154,26±13,47	0,89
6	150,87±7,04	207,17±10,92	0,73
7	134,78±7,87	115,57±15,40	1,17
8	161,21±6,50	180,77±4,13	0,89
9	153,69±5,99	201,55±25,55	0,76
10	151,20±1,24	166,40±9,66	0,91
11	143,01±6,05	178,11±29,74	0,80
12	164,54±4,49	155,31	1,06
13	205,85±7,59	172,80±39,086	1,19
14	134,25±1,76	135,23±39,59	0,99
15	150,21±5,86	174,68±31,89	0,86
16	196,86±9,19	157,36±21,51	1,25
17	132,22±2,92	179,80±12	0,74
18	193,51±4,15	165,53±34,15	1,17
19	147,66±6,74	150,94±28,87	0,98
20	175,29±6,51	196,26±5,36	0,89
21	132,69±5,37	133,26±6,79	0,99

Tabela 23 (continuação): Teores médios de fenóis totais (mg AG/100g p.s.) para cada amostra, obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu e por HPLC-DAD

Amostra	Folin-Ciocalteu	HPLC-DAD	Folin Ciocalteu/HPLC
	Teor médio de fenóis totais (mg AG/100g p.s.)	Teor médio de fenóis totais (mg AG/100g p.s.)	
22	145,82±3,03	120,09±0,77	1,21
23	142,40±4,94	141,59±5,77	1,00
24	167,92±1,06	210,13	0,79
25	134,44±3,61	137,04±48,55	0,98
26	143,60±4,26	165,02±17,04	0,87
27	156,81±2,30	136,68±8,83	1,15
28	152,71±3,74	57,55±19,55	2,65
29	136,32*	105,28	1,29
30	146,00±10,29	156,98±19,83	0,93
31	107,51±0,49	99,59±14,06	1,08
32	156,03±6,12	207,17	0,75
33	178,87±3,28	216,96±22,74	0,82
34	144,82±4,74	143,15±9,06	1,01
35	135,87±3,36	120,43±19,91	1,13
36	150,14±4,89	188,0±3,62	0,79
37	162,80±9,34	123,04±9,62	1,32
38	142,60±1,86	101,62±23,36	1,40
39	168,97±6,54	170,83±12,47	0,99
40	151,02±7,23	171,64±66,94	0,87
41	134,41±4,19	134,57±14,34	0,99
42	133,68±5,15	124,59±35,87	1,07
43	100,30±4,81	132,19±5,26	0,76
44	121,79±3,47	155,66±15,26	0,78
45	188,56±4,76	165,87±37,15	1,14

Tabela 23 (continuação): Teores médios de fenóis totais (mg AG/100g p.s.) para cada amostra, obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu e por HPLC-DAD

Amostra	Folin-Ciocalteu	HPLC-DAD	Folin Ciocalteu/HPLC
	Teor médio de fenóis totais (mg AG/100g p.s.)	Teor médio de fenóis totais (mg AG/100g p.s.)	
46	160,67±19,07	167,51±9,95	0,96
47	142,85±1,60	140,04±18,29	1,02
48	118,00±0,50	143,68±3,02	0,82
49	109,62±4,12	96,09±5,87	1,14
50	145,64±10,91	133,72±13,89	1,09
51	138,73±7,65	164,53±26,85	0,83
Global	Média±DP	Média±DP	

*- Amostras que só foi possível realizar um ensaio, dada à pouca quantidade de amostra existente

Os resultados apresentados na Tabela 23 mostram que os teores de fenóis totais determinados a partir do método de Folin são superiores aos determinados pelo método de HPLC e para a amostra 28 o valor é cerca de 3 vezes superior.

Em face do que foi dito anteriormente os teores entre amostras só podem ser comparados para o mesmo método de quantificação.

De forma a perceber estas variações, analisaram-se os perfis cromatográficos das amostras assinaladas na tabela, que surgem representados na Figura 49. Verifica-se que os perfis são muito semelhantes. No entanto a partir dos 80 minutos é que se verificam algumas diferenças nos perfis, principalmente para a amostra 28 (amostra representada a azul claro e destacada no cromatograma), que pode ser justificativo para estas variações mencionadas, uma vez que apresenta um perfil cromatográfico muito diferente das restantes. A mesma variação era observada nos triplicados que tinham sido preparados de forma independente. Assim, para esta amostra alguns dos compostos que podem estar a reagir com o reagente de Folin, podem não ser detetados por HPLC-DAD, o que provoca uma variação de 300% entre as duas técnicas analíticas utilizadas.

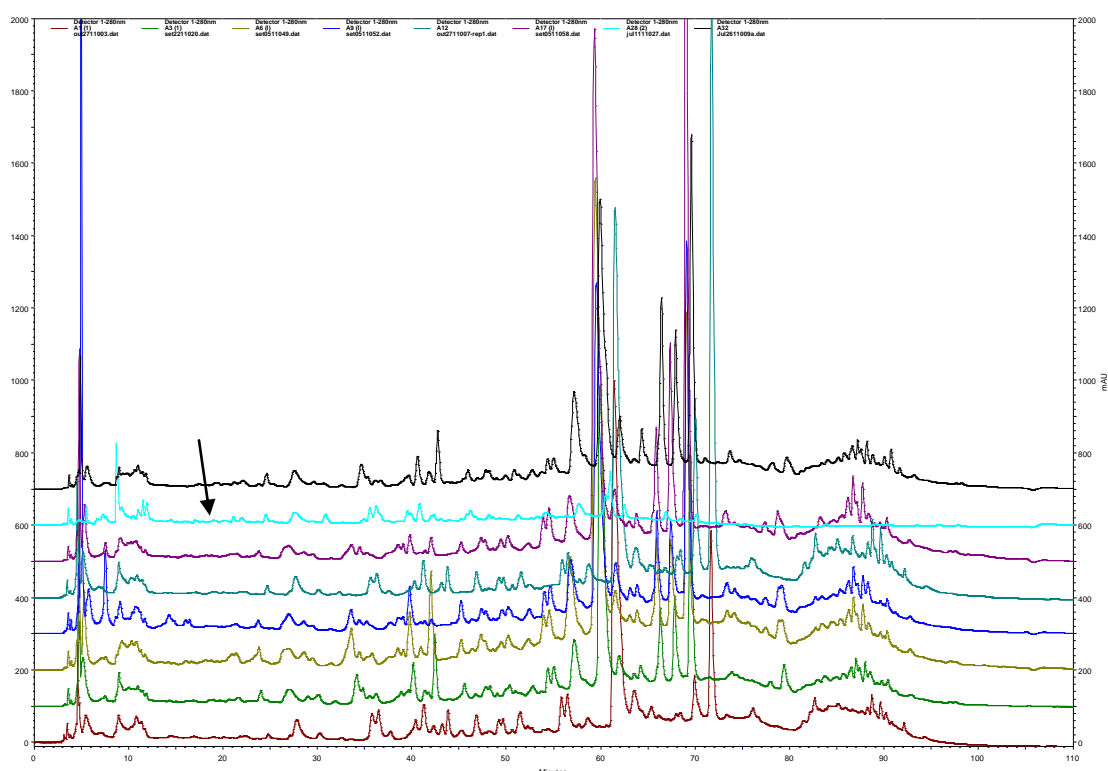


Figura 49: Sobreposição dos perfis cromatográficos das amostras assinaladas na Tabela 23, obtidos por HPLC-DAD a 280nm; Legenda: Amostra 1, amostra 3, amostra 6, amostra 9, amostra 12, amostra 17, amostra 28 (assinalada no cromatograma) e amostra 32

Como tal, atendendo aos valores apresentados, verifica-se uma fraca relação ($R^2 = 0,3867$) entre os dois métodos utilizados para quantificar fenóis (Figura 50), dadas as limitações encontradas em ambos. No entanto, o método de Folin é um método usado tradicionalmente e tendo em conta os valores referenciados na bibliografia: 170-3400 mg AG/100g amostra (Lopez Martinez, *et al.*, 2009) e 167,4mg AG/100g de peso seco (Mora Rochin, *et al.*, 2010), os valores obtidos para as amostras analisadas pelo método de Folin são os que se aproximam dos referenciados para este mesmo método.

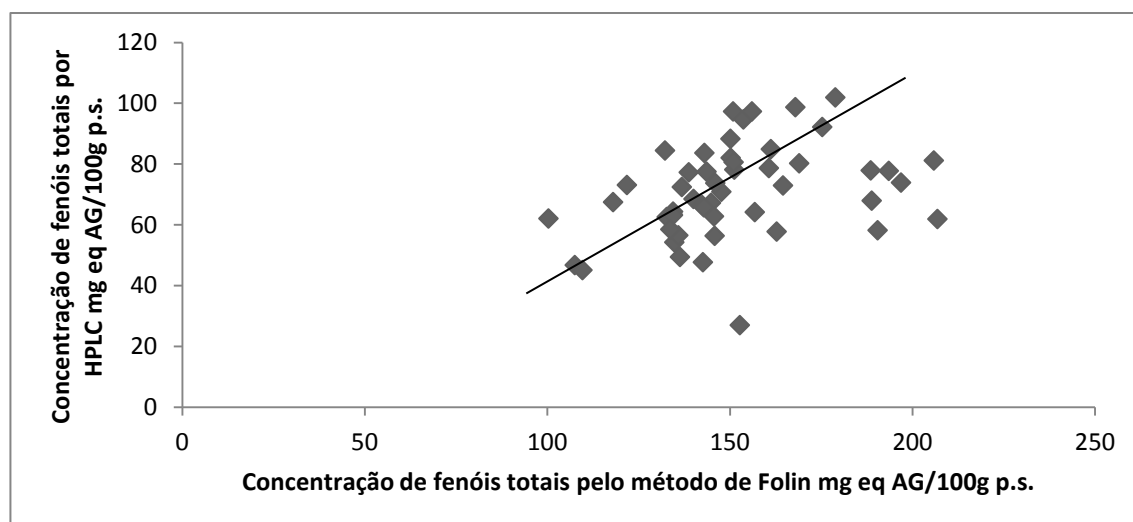


Figura 50: Correlação para os teores de fenóis totais obtidos por ambas as técnicas de quantificação utilizadas

A Tabela 23 e Figura 51 demonstram que a amostra que apresenta teor mais elevado em fenóis totais é a amostra 3 (Broa 21 A) (206,83 mg de eq AG/100g p.s. milho), não existindo muita diferença em relação à amostra 13 (Broa 124) (205,85 mg de eq AG/100g p.s. milho), enquanto a amostra 43 (VA 2003) (100,30 mg de eq AG/100g p.s. de milho) é a que apresenta menor teor (amostra com preenchimento rosa no gráfico), relativamente às restantes amostras, bem como em relação à VA 2009 (também com preenchimento cor de rosa no gráfico). Comparativamente, verificou-se que as amostras que apresentam maior teor de fenóis são as diferentes variedades denominadas de “broa”. Estas variedades encontram-se preenchidas a cor de laranja no gráfico e os valores obtidos para estas são superiores ou muito próximos dos referenciados bibliograficamente. Surgem também destacadas em relação à amostra de referência, BS22.

Para comparar as amostras entre si, estas foram agrupadas pela cor e no gráfico da Figura 52 apresentou-se os teores médios de fenóis totais para cada grupo de amostras: amarelas, brancas e amarelas-alaranjas, tal como já se tinha feito para a análise dos compostos voláteis, mas neste caso para ambos os métodos de quantificação (Folin-Ciocalteu e HPLC-DAD).

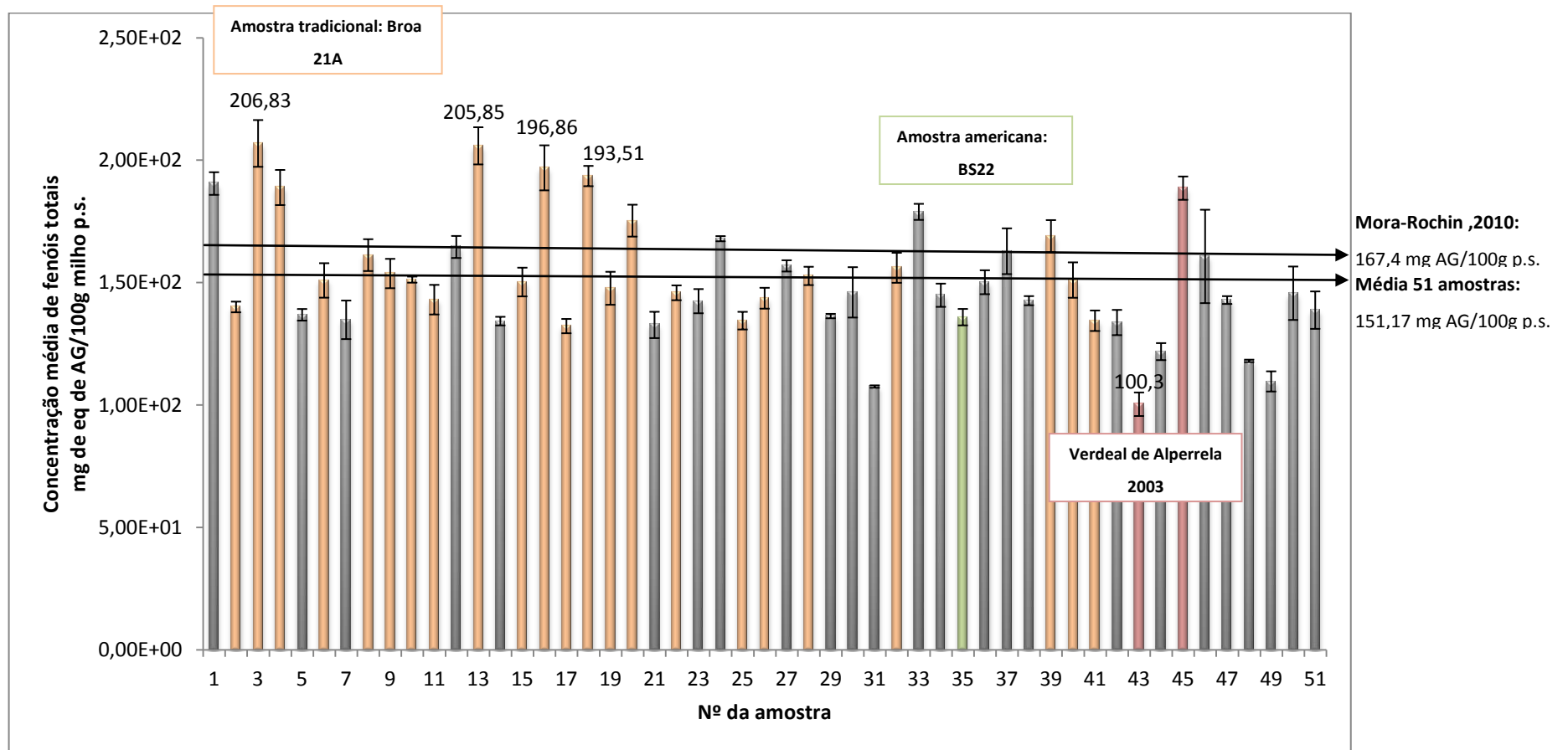


Figura 51: Teores médios de fenóis totais obtidos por espectrofotometria (Folin-Ciocalteu) para cada amostra (n=3)

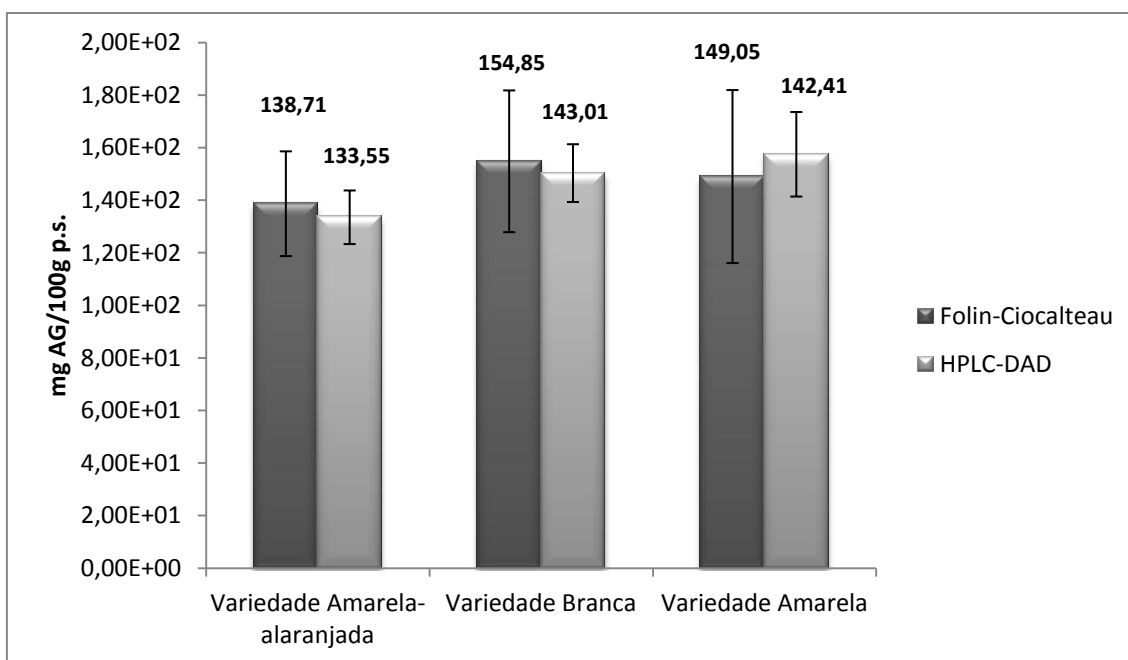


Figura 52: Teores médios de fenóis totais obtidos por ambas as técnicas de quantificação para cada variedade: variedades amarelas-alaranjadas (n=3), variedades brancas (n=24), variedades amarelas (n=24)

Em estudos feitos na determinação de fenóis totais em amostras de milho de cor amarela e branca (Mora Rochin, *et al.*, 2010) obtiveram-se valores de 137,3 mg AG/100g p.s. e 170mg AG/100g p.s., respetivamente. Comparando, com os resultados obtidos neste trabalho verificou-se que, embora os resultados sejam mais baixos, também o milho branco parece apresentar maior teor em fenóis totais (154,85 mg AG/100g p.s.), comparativamente às variedades de outra cor. Em relação às variedades amarelas, estas apresentam teor mais elevado (149,05 mg AG/100g p.s.) do que o referenciado na bibliografia. No entanto, os resultados não apresentam diferenças estatisticamente significativas, quando as amostras são agrupadas pela cor.

4.2.2.2 Quantificação de flavonóides totais por espectrofotometria e por HPLC-DAD

Os flavonóides totais também foram quantificados espectofotometricamente, utilizando como padrão a catequina e a partir dos resultados obtidos na análise por HPLC foi possível quantificar os flavonóis presentes nas amostras.

A análise por HPLC-DAD das amostras nos diversos comprimentos de onda, verificou-se que estas apresentavam picos pequenos a 360nm (c.d.o. caraterístico dos flavonóis - Figura 53). Como tal, o extrato que se utilizou para a análise por HPLC foi o concentrado, sobre o qual já foram referidas algumas considerações na secção 4.2.2.1. Os resultados relativos às absorvâncias lidas no espectrofotómetro a 510nm foram obtidos em triplicado, tendo-se determinado para cada amostra a concentração média de flavonóides totais, o DP e o DPr (Tabela h, Anexo III). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de catequina/100g peso seco.

Relativamente à quantificação por HPLC-DAD, o teor em flavonóis foi calculado utilizando as áreas obtidas a 360nm, através de uma reta de calibração de quercetina (Tabela i, figura d, Anexo III) (0,5-25ppm), uma vez que este é o padrão mais comumente utilizado para doseamento de flavonóis e também é um composto que já foi identificado na bibliografia, como estando presente em amostras de milho (Mohsen & Ammar, 2009).

A Tabela 24 apresenta as concentrações obtidas para cada amostra, considerando os dois métodos de determinação, bem como as concentrações em fenóis, flavonóides e flavonóis totais.

Tabela 24: Teor médio de fenóis totais e flavonóides totais obtidos pelos dois métodos de quantificação (Espectrofotometricamente- Folin Ciocalteu e HPLC-DAD)

Amostras	FENÓIS TOTAIS		FLAVONÓIDES TOTAIS	HPLC-DAD
	Folin Ciocalteu (mg eq AG/100g p.s.)	HPLC-DAD (mg eq AG/100g p.s.)	Teor médio de flavonóides totais (mg eq CAT/100g p.s.)	Teor médio de flavonóis totais (mg eq Querc/100g p.s.)
1	190,45±4,62	116±12,74	16,40±0,32	23,91±0,49
2	140,03±2,19	137,16±13,13	13,51±0,98	24,68±0,38
3	206,83±9,55	123,93±18,88	21,18±0,34	24,89±2,23
4	188,83±7,17	136,03±33,99	27,27±1,74	23,45±4,49
5	136,83±2,37	145,00±12,66	19,87±0,70	24,19±3,38
6	150,87±7,04	194,73±21,84	24,68±1,23	36,23±3,11
7	134,78±7,87	108,64±14,47	15,34±0,64	16,74±1,72
8	161,21±6,50	169,92±3,88	27,59±0,47	30,77±0,15
9	153,69±5,99	189,47±24,03	14,38±0,83	32,70±3,72
10	151,20±1,24	156,41±9,09	1,47±0,15	24,44±0,43
11	143,01±6,05	167,43±27,95	13,70±0,96	27,19±3,79
12	164,54±4,49	146*	17,66±0,36	25,62*
13	205,85±7,59	162,44±36,74	18,98±0,14	29,81±6,62
14	134,25±1,76	127,12±37,22	38,91±1,47	21,81±5,85
15	150,21±5,86	164,20±29,99	16,98±0,72	28,53±4,19
16	196,86±9,19	147,91±20,22	33,21±1,38	26,68±3,28
17	132,22±2,92	169,03±11,28	15,81±0,51	28,04±1,85
18	193,51±4,15	155,60±32,10	15,47±0,43	23,28±4,47
19	147,66±6,74	141,88±27,14	24,38±0,70	26,83±3,09
20	175,29±6,51	184,47±5,04	15,83±0,66	26,55±0,64
21	132,69±5,37	125,27±13,59	18,77±0,79	22,23±2,60
22	145,82±3,03	112,89±0,72	3,85±0,26	18,51±0,47

Tabela 24 (continuação): Teor médio de fenóis totais e flavonóides totais obtidos pelos dois métodos de quantificação (Espectrofotometricamente-Folin Ciocalteu e HPLC-DAD)

Amostras	FENÓIS TOTAIS		FLAVONÓIDES TOTAIS	HPLC-DAD
	Folin Ciocalteu (mg eq AG/100g p.s.)	HPLC-DAD (mg eq AG/100g p.s.)	Teor médio de flavonóides totais (mg eq CAT/100g p.s.)	Teor médio de flavonóis totais (mg eq Querc/100g p.s.)
23	142,40±4,94	133,10±5,41	20,91±0,81	25,32±0,91
24	167,92±1,06	197,52*	S/ A	31,57*
25	134,44±3,61	128,82±45,63	29,19±1,17	22,97±9,26
26	143,60±4,26	155,12±16,02	15,32±0,55	29,96±2,96
27	156,81±2,30	128,47±8,31	11,26±0,51	26,51±1,26
28	152,71±3,74	54,09±18,37	6,81±0,32	10,47±1,98
29	136,32*	98,96*	12,66±0,19	21,64*
30	146,00±10,29	147,55±18,64	10,66±0,17	27,79±2,72
31	107,51±0,49	93,62±13,22	36,19±1,11	14,40±2,60
32	156,03±6,12	128,73*	3,08±0,21	19,23*
33	178,87±3,28	203,95±21,37	27,23±0,26	31,00±1,40
34	144,82±4,74	134,56±8,51	16,53±0,26	24,13±0,26
35	135,87±3,36	113,19±18,71	11,82±0,23	22,62±3,62
36	150,14±4,89	176,72±3,39	21,23±0,94	29,43±0,43
37	162,80±9,34	115,66±9,03	13,36±0,40	17,51±2,51
38	142,60±1,86	95,52±21,95	33,21±1,38	15,79±4,80
39	168,97±6,54	160,57±11,72	14,09±0,38	29,30±3,17
40	151,02±7,23	161,35±62,92	11,28±0,36	25,89±9,96
41	134,41±4,19	126,50±13,48	13,94±0,89	23,55±1,89
42	133,68±5,15	117,11±33,72	19,04±0,19	17,15±4,49

Tabela 24 (continuação): Teor médio de fenóis totais e flavonóides totais obtidos pelos dois métodos de quantificação (Espectrofotometricamente- Folin Ciocalteu e HPLC-DAD)

Amostras	FENÓIS TOTAIS		FLAVONÓIDES TOTAIS	HPLC-DAD
	Folin Ciocalteu (mg eq AG/100g p.s.)	HPLC-DAD (mg eq AG/100g p.s.)	Teor médio de flavonóides totais (mg eq CAT/100g p.s.)	Teor médio de flavonóis totais (mg eq Querc/100g p.s.)
43	100,30±4,81	124,26±4,94	11,77±0,77	18,85±0,96
44	121,79±3,47	146,32±14,33	15,40±0,47	27,04±1,43
45	188,56±4,76	155,33±34,92	10,74±0,29	25,81±6,49
46	160,67±19,07	157,46±9,35	15,40±0,77	28,31±1,04
47	142,85±1,60	131,64±17,20	14,55±0,51	24,96±2,00
48	118,00±0,50	135,06±2,84	13,43±0,31	25,00±0,15
49	109,62±4,12	90,31±5,52	20,11±0,44	17,87±0,36
50	145,64±10,91	125,70±13,07	17,38±0,59	24,40±2,70
51	138,73±7,65	154,67±25,85	15,89±0,36	25,96±3,70
Global	Valor médio ± DP	Valor médio ± DP	Valor médio ± DP	Valor médio ± DP

*- Só foi possível realizar um ensaio, dada à pouca quantidade de amostra existente; S/A – sem quantidade de amostra para analisar

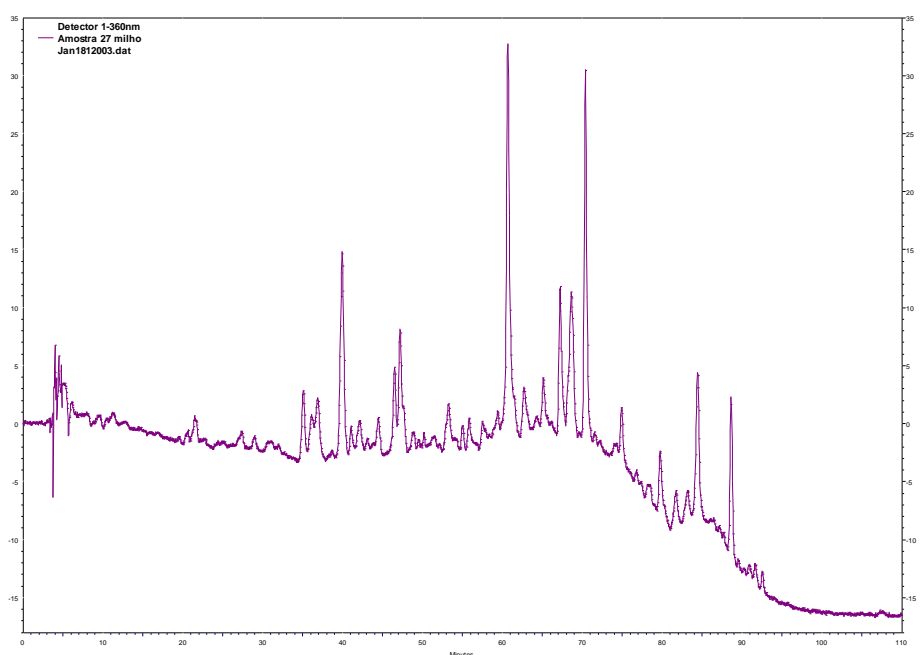


Figura 53: Perfil cromatográfico de um extrato obtido por HPLC-DAD a 360nm

Os valores obtidos para os teores de flavonóis (HPLC-DAD) e flavonoides (espectrofotometria) pelas diferentes técnicas são diferentes devido ao modo de expressar os resultados. Os flavonóis foram quantificados por HPLD-DAD utilizando uma reta de quercetina e a área total a 360nm e obtiveram-se valores a variar entre $10,47 \pm 1,98$ a $36,23 \pm 3,11$ mg eq Querc/100g p.s. milho. Como se pode ver na Figura 53 os compostos que absorvem a 360nm eluem principalmente entre os 30 e os 90 minutos. Ao considerar a área total do cromatograma, o valor obtido poderá estar por excesso pelo fato dos compostos considerados pertencerem a outras famílias.

As análises foram feitas em triplicado, salvo algumas exceções em que a quantidade de amostra não era suficiente.

A Figura 54 apresenta as sobreposições dos perfis cromatográficos para as 4 amostras que apresentam maior teor em flavonóides e para as duas, que contrariamente, apresentam teor mais baixo.

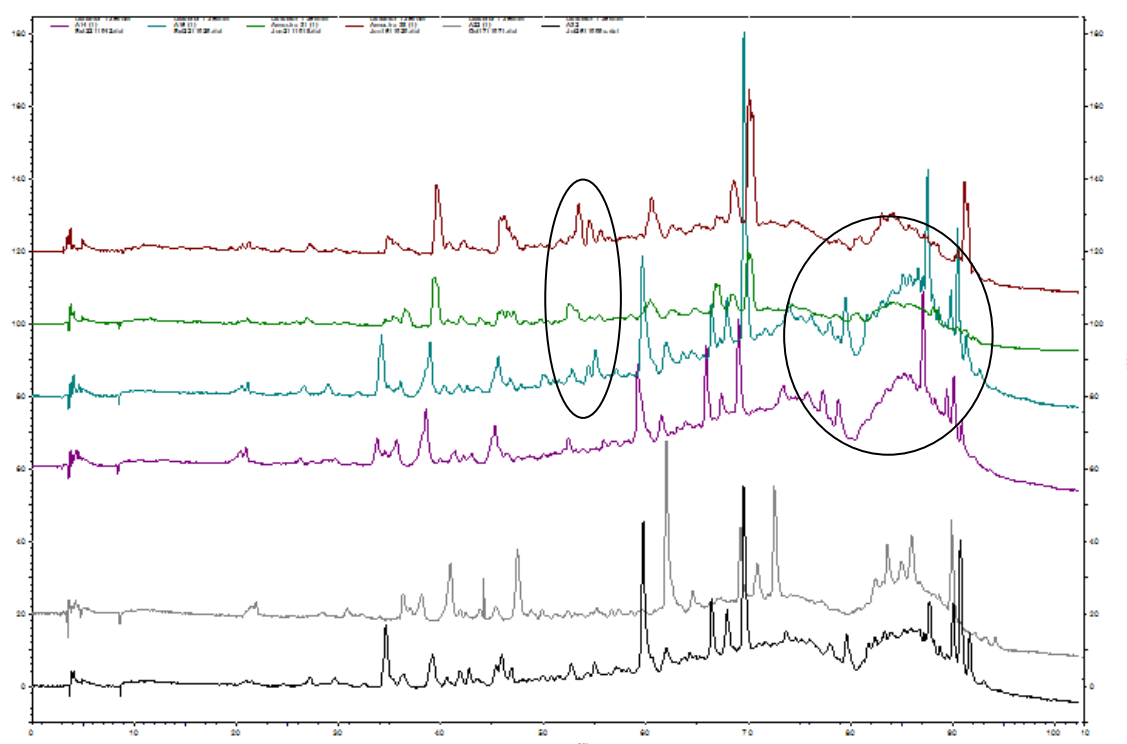


Figura 54: Comparação dos perfis cromatográficos a 360nm para as amostras com teor mais elevado de flavonóides totais: **amostra 14**, **amostra 16**, **amostra 31** e **amostra 38** e teor mais baixo: **amostra 22** e **amostra 32**

Por análise dos perfis cromatográficos, verifica-se que os perfis são muito semelhantes para os dois conjuntos de amostras, exceto nas zonas assinaladas na Figura 54 nas 4 amostras com teor mais elevado, o que pode ser justificativo para esse teor.

A análise dos resultados apresentados na Figura 55 mostra que a amostra que apresenta maior teor em flavonóides totais é a amostra 14 - amostra CMSPH6 (38,91 mg eq catequina/g p.s. milho) e a que apresenta menor teor é a amostra 32 – Broa 48 (1,47mg eq catequina/100 g milho), comparativamente às restantes amostras. A mesma analogia se verifica em relação à amostra de referência BS22. A média de flavonóides totais nas 51 amostras surge também traçada no gráfico, as diversas variedades “CMSPH” encontram-se com preenchimento azul, as diversas variedades “Amíudo” com preenchimento a vermelho e as diversas “Broa” com preenchimento cor de laranja. Estas últimas, distinguem-se das restantes por apresentarem, a maior parte deles teores menores de flavonoides totais em relação às restantes variedades e

à variedade de referência (BS22).

Para os teores de flavonóides, as amostras parecem estar mais relacionadas com outra variedade americana, a NDB, do que com a variedade de referência BS22. Verifica-se também que existem diferenças significativas entre as diversas amostras, o que demonstra uma enorme variabilidade entre elas.

Não foram encontrados até ao momento presente valores de teores de flavonóides totais em farinhas de milho expressos em função da catequina, mas Liu, *et al.*, (2011) quantificaram flavonóides totais em extratos de milho em diversas frações. Os resultados foram expressos em μg de equivalentes de rutina (RE) por grama de extrato seco de milho (DCS) e variam entre 4,2 a 69,4 $\mu\text{g RE/g DCS}$, referenciados em relação à fração de éter de petróleo e fração butanólica. Para a fração etanólica foram referenciados valores de 17,9 $\mu\text{g RE/g DCS}$.

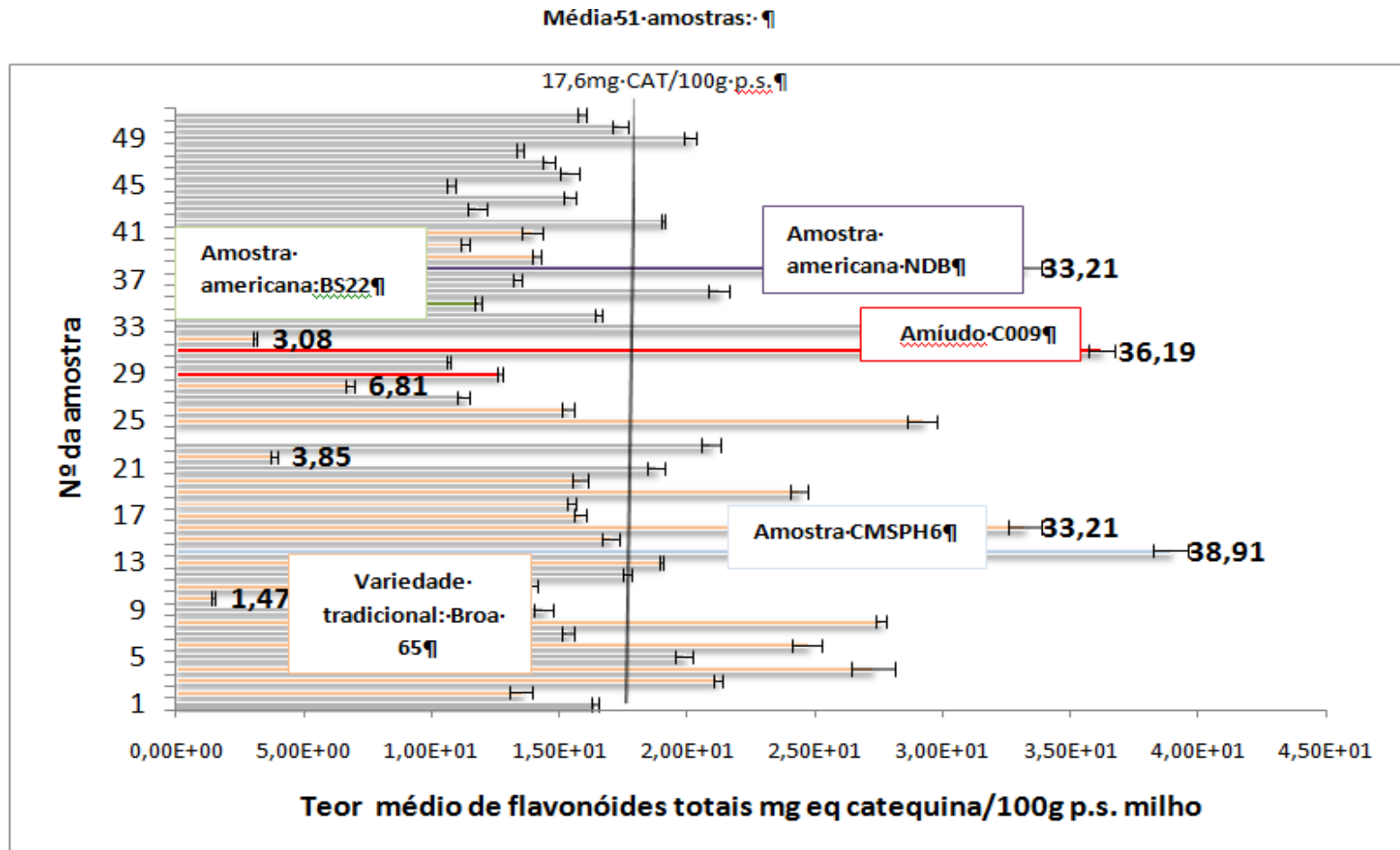


Figura 55: Teores médios de flavonóides totais obtidos por espectrofotometria a 510nm para cada amostra (n=3)

4.2.2.3 Análise de compostos fenólicos solúveis e insolúveis

De forma a avaliar a presença de compostos fenólicos na forma conjugada, que não foram extraídos nas condições anteriormente referidas, recorreu-se a um procedimento descrito na bibliografia (Mira, *et al.*, 2008), que visa a análise de compostos fenólicos solúveis (livres e conjugados) e insolúveis, recorrendo à hidrólise alcalina dos extratos. Assim, seguiu-se o procedimento descrito em 3.3.1 e todas as frações (fenóis livres, fenóis conjugados e insolúveis) foram concentradas para o mesmo volume final (3mL).

As figuras (Figura 56 a Figura 59) apresentam os perfis cromatográficos obtidos para as diferentes frações: solúveis, conjugados e insolúveis a 280nm, 320nm e 360nm.

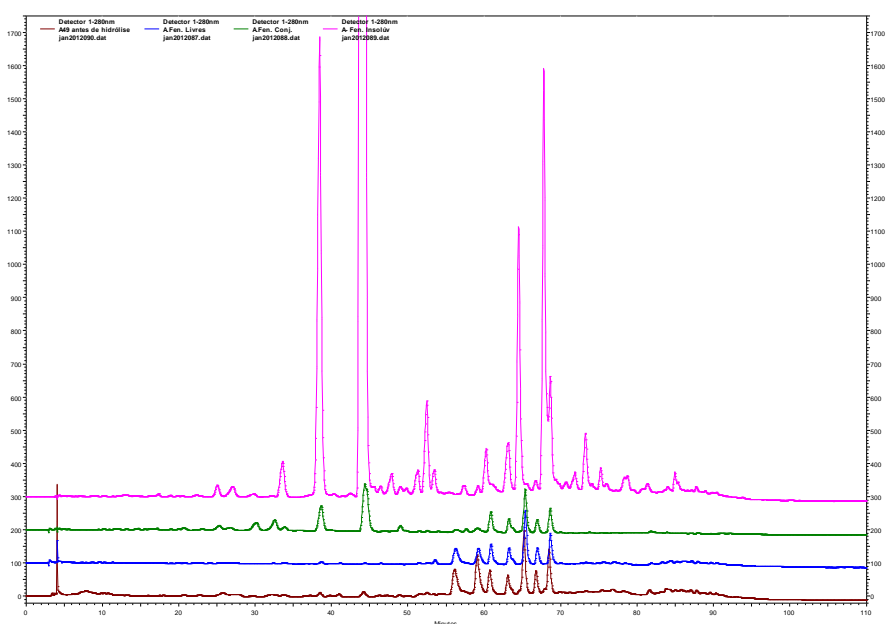


Figura 56: Comparação do perfil cromatográfico a 280nm do extrato original de farinha de milho e respectivas fracções de ácidos fenólicos livres, conjugados e insolúveis

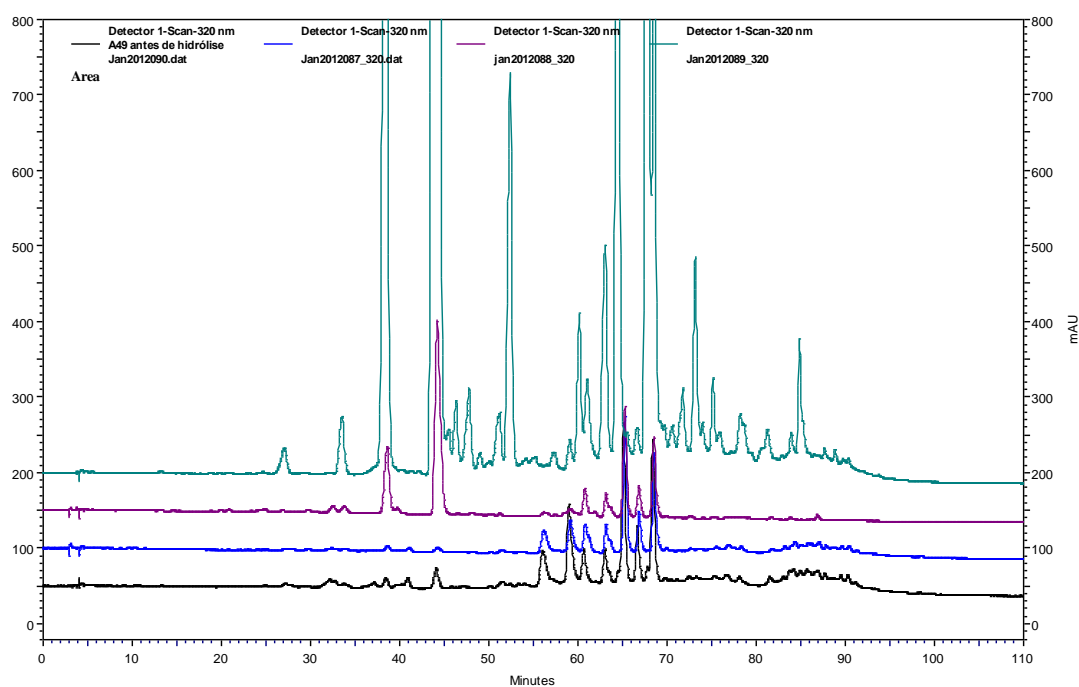


Figura 57: Comparação do perfil cromatográfico a 320nm do extrato original de farinha de milho e respectivas fracções de ácidos fenólicos livres, conjugados e insolúveis

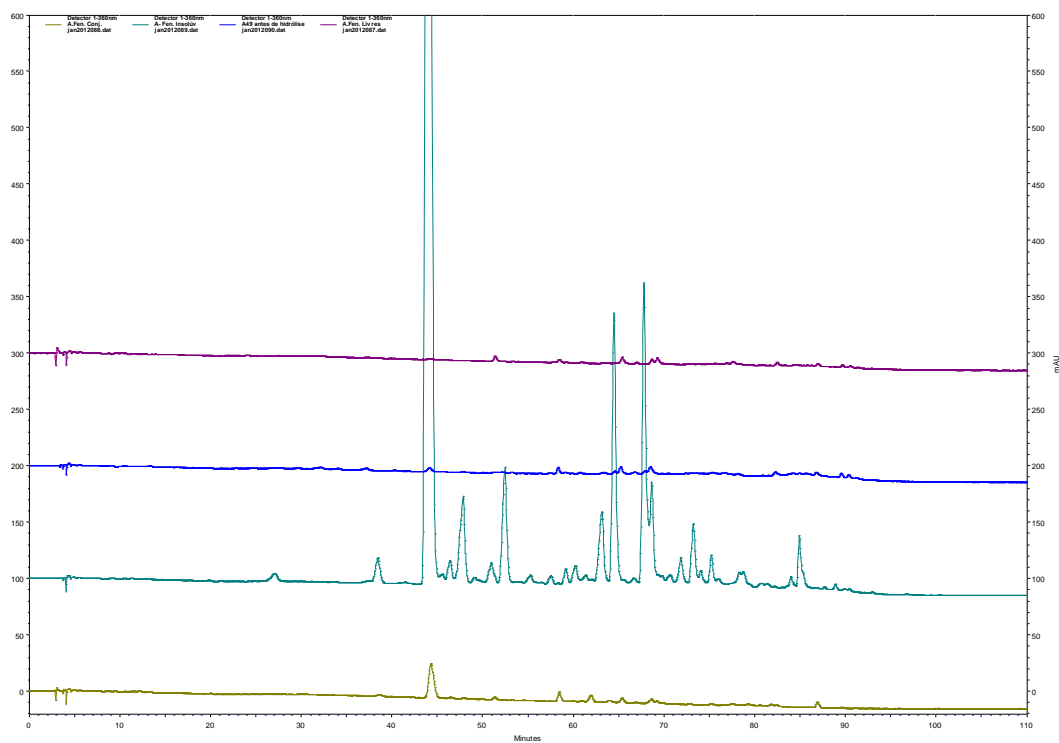


Figura 58: Comparação do perfil cromatográfico a 360nm do extrato original de farinha de milho e respectivas fracções de ácidos fenólicos livres, conjugados e insolúveis

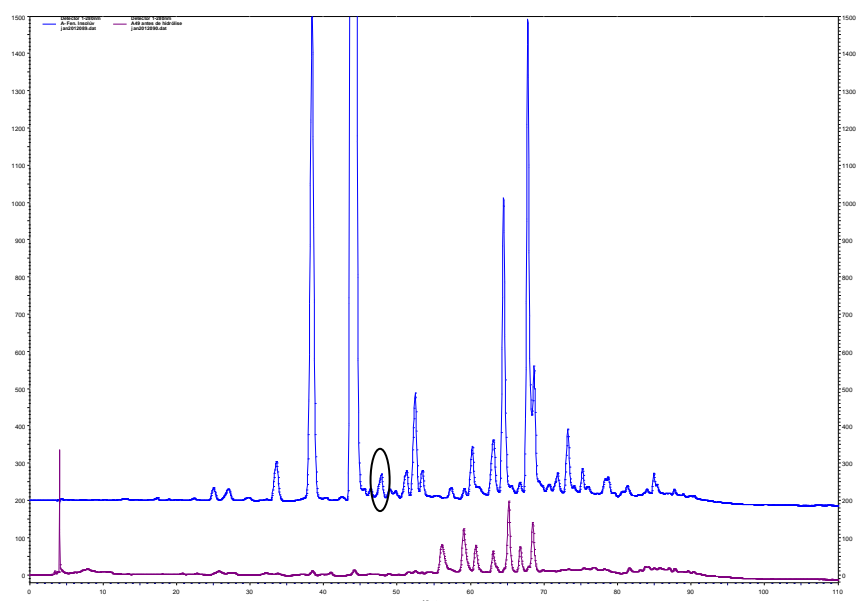


Figura 59: Comparação do perfil cromatográfico a 280nm obtido para a fração dos **compostos fenólicos insolúveis** e **para o extrato original**

A análise destas figuras mostra que a fração que apresenta maior número de compostos, é a fração fenólica dos compostos insolúveis, onde se observa o aumento da maior parte dos picos que estão presentes nesta fração em relação ao extrato original. Os espectros correspondentes aos picos que surgem na fração dos compostos insolúveis estão em Anexo (Tabela j, Anexo III) e são essencialmente ácidos cinâmicos, que absorvem a 320nm, tal como também se pode comprovar na Figura 57, em que a maior parte dos picos surge com maior intensidade.

Com estes ensaios é possível concluir que futuramente deverão ser realizados estes ensaios de hidrólise, uma vez que, embora a maior parte dos compostos se encontre na forma insolúvel na farinha de milho, quando esta é ingerida sob a forma de alimento, estes compostos podem libertar-se no organismo. Assim, deverá ser feita em paralelo um ensaio de simulação do processo de digestão (processo *in vitro*) que ocorrerá em meio ácido.

O ácido ferúlico, identificado nas amostras de farinha de milho (como se poderá ver de seguida), poderá ser um exemplo disso, uma vez que surge com um pico maior, nas frações dos compostos insolúveis.

Futuramente, será importante identificar e quantificar os compostos que surgem nas diferentes frações, principalmente na fração dos compostos fenólicos insolúveis, uma vez que é a que apresenta maior teor de compostos.

4.2.2.4 Identificação e quantificação de compostos fenólicos por HPLC-DAD

Analisados os perfis cromatográficos obtidos para cada amostra (n=3) e tendo em conta a semelhança entre eles, utilizou-se somente um perfil cromatográfico para fazer a comparação entre as amostras (Figura e; f, Anexo III).

Na Figura 60 é apresentado um perfil cromatográfico típico de um extrato de farinha de milho, obtido segundo o procedimento descrito em 3.3.4.

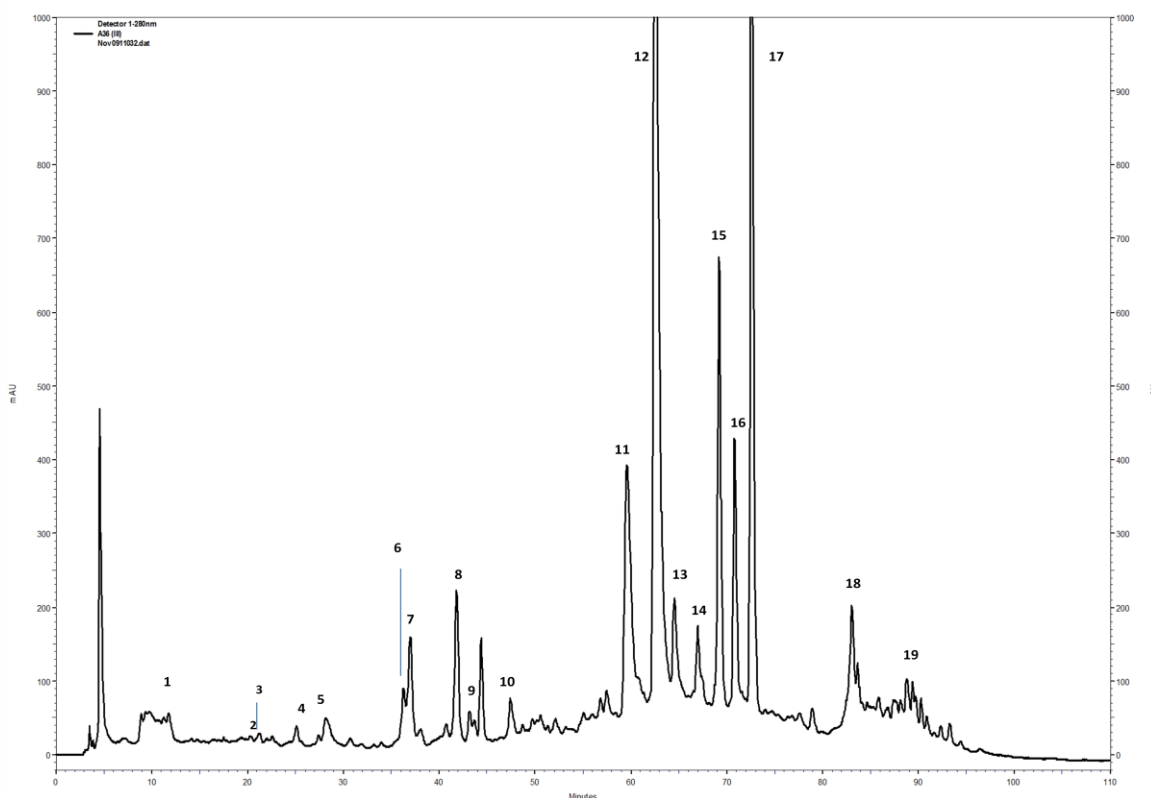


Figura 60: Perfil cromatográfico característico das amostras de farinha de milho obtido a 280nm com uma possível identificação de compostos fenólicos apresentada na Tabela 25

Considerando o perfil cromatográfico tentou-se proceder, à identificação de compostos presentes nas amostras, por comparação dos tempos de retenção e espectros de absorção dos picos da amostra e os espectros de absorção de misturas de padrões. As misturas de padrões continham os compostos que estão descritos na bibliografia (Andreasen, *et al.*, 2001; Angelo & Jorge, 2007; Pedreschi & Cisneros - Zevallos, 2007; Mohsen & Ammar, 2009; Lopez Martinez, *et al.*, 2009), como sendo os compostos fenólicos presentes em amostras de milho e ainda outros compostos que, atendendo aos tempos de retenção, poderiam estar presentes na amostra. De todos os compostos analisados nas misturas padrão, somente se consideraram os que originavam picos com o mesmo tempo de retenção nos picos das amostras. Para confirmar a presença destes compostos realizaram-se fortificações das amostras com os padrões respetivos.

Posteriormente procedeu-se à análise dos mesmos padrões por HPLC-MS/MS e de uma amostra por MRM, de forma a identificar os compostos na amostra, por pesquisa da transição característica que estes apresentam: se for detetado na mistura padrão e na amostra, para o mesmo tempo de retenção, considera-se o pico identificado. Esta análise encontra-se descrita na secção 4.4.

Tabela 25: Tempo de retenção, c.d.o. máximo de absorção e identificação para cada um dos compostos fenólicos nas amostras de milho

Pico	Tr (min)	c.d.o máximo de absorção (nm)	Identificação
1	11,3	257	Ácido gálgico ⁽¹⁾
2	20,3	252;282	Ácido protocatechuico ⁽¹⁾⁽³⁾
3	21,3	260;286	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico ⁽³⁾
4	25	262;290	⁽⁴⁾
5	27,41	261;288	Ácido vanílico ⁽¹⁾
6	35,90	299; 322	Ácido cafeico ⁽²⁾⁽³⁾
7	37,07	280; 313	Vanilina ⁽¹⁾⁽²⁾
8	41,68	310	Ácido <i>p</i> -cumárico ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

Tabela 25 (continuação): Tempo de retenção, c.d.o. máximo de absorção e método de identificação para cada um dos compostos nas amostras de milho

Pico	Tr (min)	c.d.o máximo de absorção (nm)	Identificação
9	43	310	Siringaldeído ^{(1) (2)}
10	47,44	290;322	Ácido ferúlico ^{(1) (2) (3)}
11	59,61	290	(4)
12	63,20	295	(4)
13	64,89	291	(4)
14	66,90	291;314	(4)
15	69,20	290;313	(4)
16	71,07	292;320	(4)
17	73,20	320	(4)
18	82,95	311	(4)
19	88,79	292;317	(4)

(1) – Identificação por fortificação; (2) – Identificação por semelhança de espectros; (3) – Identificação por HPLC-MS/MS; (4) – Não foi possível identificar

A análise da Tabela 25 mostra que não foi possível identificar a maior parte dos compostos e que só quatro compostos (vanilina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e siringaldeído) foram identificados por fortificação e semelhança de espectros por HPLC-DAD.

Na tabela em anexo (Tabela k, Anexo III) apresentam-se os compostos que foram analisados nas misturas padrão e por fortificação das amostras, bem como os tempos de retenção, os espectros e os compostos mencionados na bibliografia, através da análise por HPLC-DAD. Para os 4 compostos mencionados, apresenta-se a sobreposição dos espectros obtidos para a amostra e para o padrão e os restantes 12 compostos apresentados na tabela não foram possíveis de identificar por HPLC-DAD.

Os teores de vanilina, ác. *p*-cumárico, siringaldeído e ác. ferúlico foram quantificados por HPLC-DAD. As retas de calibração foram elaboradas na gama de concentrações 0,5 a 10 ppm e estão apresentadas em Figuras g a j, Anexo III.

A Tabela 26 apresenta os teores determinados para cada composto nas amostras em estudo.

Tabela 26: Teores médios dos compostos identificados por HPLC-DAD nas amostras

Amostra	Valina		<i>p</i> -Cumárico		Siringaldeído		Ácido Ferúlico	
	[] (ppm)	[] (mg eq/100g p.s.)	[] (ppm)	[] (mg eq/100g p.s.)	[] (ppm)	[] (mg eq/100g p.s.)	[] (ppm)	[] (mg eq/100g p.s.)
1	2,57	0,28	3,19	0,34	2,31	0,25	3,79	0,41
2	1,36	0,15	3,5	0,38	2,36	0,25	4,76	0,51
3	2,18	0,23	2,6	0,28	3,74	0,40	3,25	0,35
4	0,91	0,10	2,08	0,22	2,62	0,28	3,53	0,38
5	1,61	0,17	3,53	0,38	3,32	0,36	4,42	0,47
6	2,37	0,25	4,48	0,48	1,91	0,21	2,59	0,28
7	1,5	0,16	3,24	0,35	2,33	0,25	2,59	0,28
8	1,27	0,14	2,73	0,29	3,25	0,35	2,73	0,29
9	1,06	0,11	2,97	0,32	1,17	0,13	3,52	0,38
10	1,85	0,20	3,15	0,34	2,31	0,25	3,79	0,41
11	1,50	0,16	5,68	0,61	2,02	0,22	3,84	0,41
12	1,91	0,21	2,94	0,32	2,35	0,25	3,12	0,34
13	1,10	0,12	3,27	0,35	2,13	0,23	4,98	0,54
14	1,75	0,19	1,52	0,16	3,47	0,37	1,48	0,16
15	1,64	0,18	5,86	0,63	3,80	0,41	4,82	0,52
16	1,10	0,12	2,00	0,21	2,39	0,26	3,04	0,33
17	0,92	0,10	1,88	0,20	1,02	0,11	2,22	0,24
18	1,74	0,19	1,95	0,21	3,56	0,38	3,19	0,34
19	1,18	0,13	1,87	0,20	3,08	0,33	3,25	0,35
20	1,69	0,18	4,92	0,53	7,21	0,77	4,24	0,46
21	1,75	0,19	1,93	0,21	2,77	0,30	1,64	0,18
22	1,53	0,16	4,61	0,50	2,69	0,29	4,87	0,52
23	1,35	0,15	1,72	0,18	2,25	0,24	3,64	0,39
24	1,80	0,19	3,57	0,38	2,38	0,26	4,01	0,43

Tabela 26 (continuação): Teores médios dos compostos identificados por HPLC-DAD nas amostras

Amos tra	Valina		p-Cumárico		Siringaldeído		Ácido Ferúlico	
	[] (ppm)	[] (mg eq/100g p.s.)	[] (pp m)	[] (mg eq/100g p.s.)	[] (ppm)	[] (mg eq/100g p.s.)	[] (ppm)	[] (mg eq/100g p.s.)
25	2,64	0,28	4,28	0,46	0,62	0,07	2,71	0,29
26	1,80	0,19	3,36	0,36	1,04	0,11	1,21	0,13
27	7,60	0,82	2,67	0,29	2,1	0,23	1,68	0,18
28	4,94	0,53	2,54	0,27	2,29	0,25	2,43	0,26
29	1,33	0,14	2,85	0,31	2,02	0,22	2,47	0,27
30	6,57	0,71	2,95	0,32	2,66	0,29	2,61	0,28
31	4,00	0,43	1,06	0,11	1,2	0,13	0,61	0,07
32	1,80	0,19	2,61	0,28	3,63	0,39	2,33	0,25
33	2,52	0,27	4,66	0,50	3,88	0,42	5,69	0,61
34	9,00	0,97	5,19	0,56	0,60	0,06	2,51	0,27
35	4,99	0,54	2,54	0,27	2,19	0,24	3,60	0,39
36	6,59	0,71	4,36	0,47	1,86	0,20	1,97	0,21
37	1,89	0,20	5,67	0,61	3,01	0,32	4,70	0,51
38	5,87	0,63	1,55	0,17	0,87	0,09	2,39	0,26
39	7,76	0,83	3,03	0,33	2,29	0,25	3,31	0,36
40	6,02	0,65	2,96	0,32	1,54	0,17	3,42	0,37
41	1,57	0,17	4,18	0,45	4,44	0,48	3,45	0,37
42	6,61	0,71	1,76	0,19	2,69	0,29	0,61	0,07
43	6,83	0,73	2,18	0,23	0,99	0,11	0,99	0,11
44	6,96	0,75	2,70	0,29	1,42	0,15	1,55	0,17
45	8,21	0,88	2,24	0,24	2,28	0,24	2,62	0,28
46	5,02	0,54	1,62	0,17	1,94	0,21	1,19	0,13
47	1,02	0,11	3,03	0,33	3,02	0,32	4,10	0,44
48	7,93	0,85	3,75	0,40	2,10	0,23	5,12	0,55
49	5,28	0,57	1,89	0,20	1,11	0,12	2,28	0,24
50	7,33	0,79	4,2	0,45	3,68	0,40	2,84	0,31
51	1,55	0,17	3,32	0,36	2,41	0,26	2,81	0,30

A relação sinal/ruído obtida para o ponto de mais baixa concentração da reta de calibração (0,5ppm) era superior a 10 vezes, assim considerou-se o LQ 0,5ppm. No entanto, é importante referir que os resultados estão expressos em função do extrato original, que é 10vezes mais diluído do que as amostras que foram analisadas em HPLC-DAD, o que significa que se as amostras realmente não forem concentradas não

é possível detetar e quantificar estes compostos, por existirem em baixas concentrações.

Agrupando as amostras pelas respetivas cores (Figura 61), verifica-se que de uma forma geral o composto que apresenta maior teor nas variedades amarelas-alaranjadas, brancas e amarelas é a vanilina, com teor médio nas variedades amarelas-alaranjadas (0,67 mg eq/100g p.s.),contrariamente ao ácido ferúlico. Comparando o teor de vanilina nas variedades de diferentes cores, não existe diferenças significativas entre elas. Em relação à vanilina, sabe-se que é um derivado dos ácidos benzóicos, que é pouco distribuído na natureza (Angelo & Jorge, 2007).

Os teores determinados para os diferentes compostos não apresentam diferenças significativas entre eles nas variedades brancas e amarelas e entre variedades também, exceto a vanilina, como já foi referido.

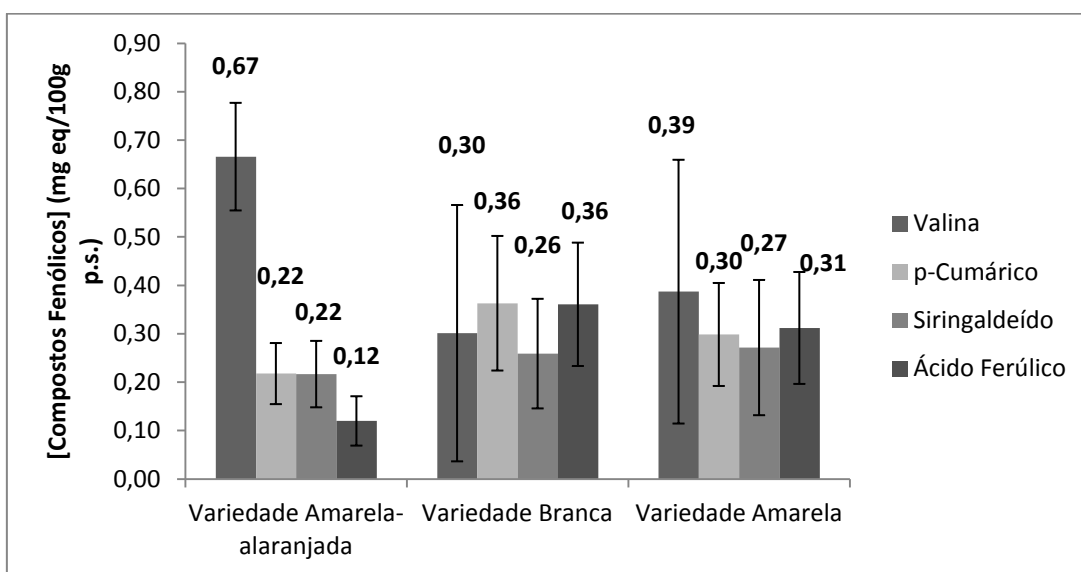


Figura 61: Teores médios obtidos por HPLC-DAD dos compostos identificados nas diferentes variedades de farinha de milho: variedade laranja (n=3), variedade branca (n=24) e variedade amarela (n=24) e respetivo DP

No entanto a presença da vanilina e do siringaldeído ainda não foi confirmada por HPLC-MS/MS.

O ácido ferúlico tem sido muito reportado na bibliografia como um dos principais compostos fenólicos presentes no milho (Holguín Acuña, *et al.*, 2007) e responsável, juntamente com o ácido *p*-cumárico pela bioatividade, atividade antioxidante e anticarcinogénica no milho branco (Lopez Martinez, *et al.*, 2009). Os teores de ácido ferúlico para as diferentes variedades de milho reportados na bibliografia são 0,34mg /100g p.s. para a variedade branca e 0,58 mg/100g p.s. para a amarela (Mora Rochin, *et al.*, 2010) e os valores encontrados neste trabalho são 0,36mg/100g p.s. para a variedade branca e 0,31mg/100g p.s. para a variedade amarela. Os valores obtidos são então concordantes para a variedade branca e inferiores para a variedade amarela.

O procedimento de extração utilizado por estes autores foi semelhante ao procedimento utilizado neste trabalho, com a diferença que no trabalho referenciado, foi utilizada a proporção 1:10 m farinha/v EtOH/H₂O 80%, enquanto no nosso trabalho foi de 2:20 m farinha/v EtOH/H₂O 50%.

4.2.2.5 Análise das amostras por HPLC-ED

O sistema de HPLC inclui um detetor eletroquímico. Comparando os cromatogramas obtidos com o detetor de DAD (a 280nm) e ED, é possível verificar quais os compostos que apresentam suposta atividade antioxidante e que poderão ter mais interesse em serem estudados (Figura 62). Os picos assinalados (picos designados de A a K por ordem de tempo de retenção) são os que correspondem a compostos que, aparentemente, apresentam atividade antioxidante. O pico D foi identificado como sendo o ácido ferúlico.

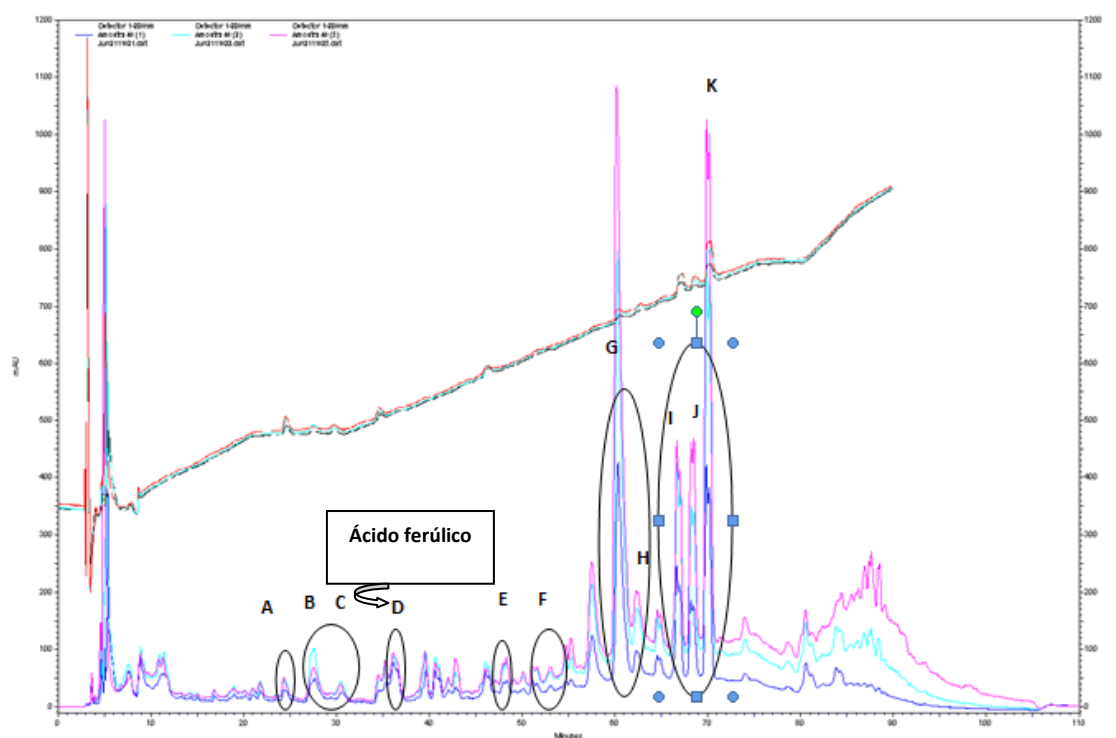
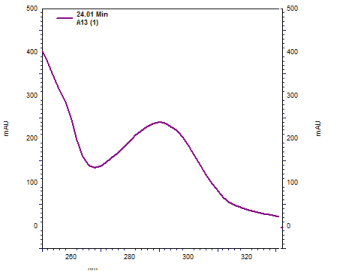
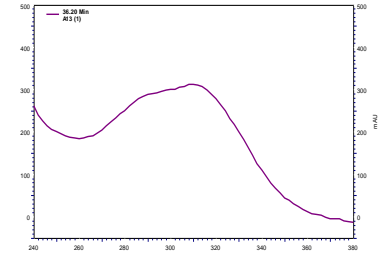
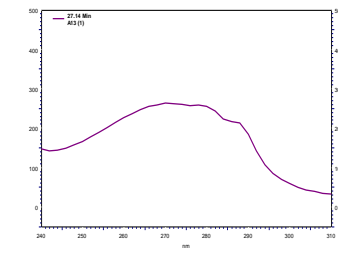
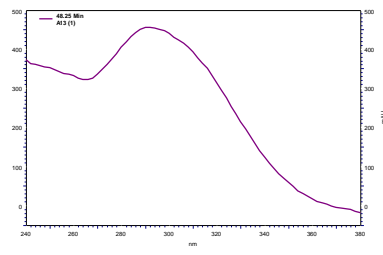


Figura 62: Sobreposição dos triplicados obtidos para uma amostra no detector de HPLC-DAD a280nm e HPLC-ED, bem com a identificação do ácido ferúlico

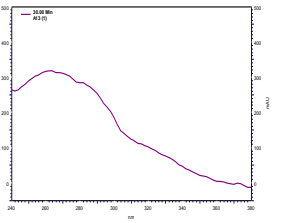
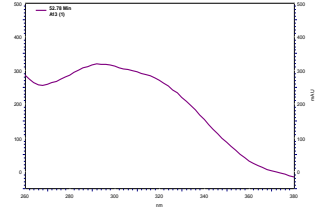
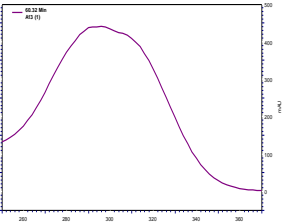
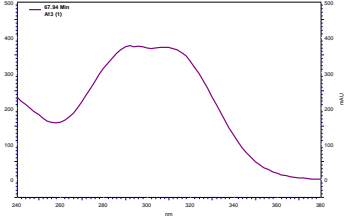
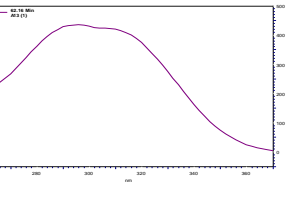
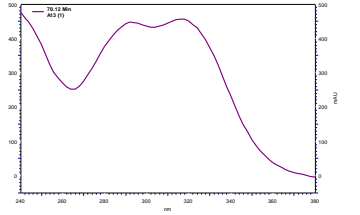
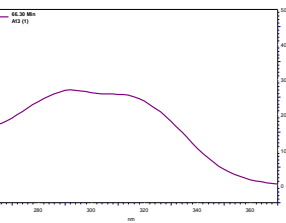
Analisaram-se por HPLC-ED as amostras que apresentavam os maiores teores em compostos fenólicos totais (tanto pelo método de Folin-Ciocalteu, como por HPLC-DAD). A tabela em anexo (Tabela I, Anexo III) apresenta as áreas obtidas por HPLC-ED para cada pico considerado bem como as áreas totais para cada amostra. Analisando os resultados verifica-se que as amostras que apresentam área total mais elevada são as amostras 9 (Broa 83), 4 (Broa 142) e 3 (Broa 21-A), contrariamente às amostras 43 (VA 2003) e 24 (CMSPH3).

Na Tabela 27 apresenta-se o tempo de retenção e os espectros de absorção correspondentes aos diferentes compostos detetados no detetor eletroquímico.

Tabela 27: Tempo de retenção e espectros obtidos pelo *software* Chromquest para cada pico com sinal no eletroquímico

Composto	Tempo de retenção (min)	Espectro UV/Vis padrão	Amáx absorção (nm) (valores aproximados)	Composto	Tempo de retenção (min)	Espectro UV/Vis padrão	Amáx absorção (nm) (valores aproximados)
A	24,00		290	D	36,20		290;320
B	27,11		280	E	48,25		290

Estudo de diferentes variedades de milho utilizadas na produção de Broa

C	30,00		270	F	52,78		290
G	60,32		290; 320	J	67,94		290;320
H	62,16		290; 320	K	70,12		290;320
I	66,30		290;320				

Por análise da tabela, verifica-se que de uma forma geral são compostos com máximos de absorção a 290 e 320nm que apresentam sinal no eletroquímico.

4.2.2.6 Atividade Antioxidante

Considerando os objetivos do trabalho foi estudada a atividade antioxidante de algumas amostras, tendo sido escolhidas amostras que apresentavam valores de fenóis totais altos (188,56 - 206,83 mg eq AG/100g amostra p.s.), médios (132,22 - 153,69 mg eq AG/100g amostra p.s.) e baixos (100,30 -109,62 mg eq AG/100g amostra p.s.), de forma a verificar de que forma o teor de fenóis totais está relacionado com a atividade antioxidante.

Assim, a Tabela 28 apresenta os valores obtidos para as duas técnicas de determinação da atividade antioxidante, nas amostras analisadas. Para algumas amostras a quantidade não foi suficiente para se determinar a atividade antioxidante pelo método de HORAC.

Tabela 28: Valores obtidos para a atividade antioxidante (AA) para o método de ORAC e HORAC

	ORAC	HORAC
Amostra	AA (μmol CAET/100g)	AA (μmol CAET/100g)
3	2303,98±205,54	2201,05±166,22
4	1978,41±184,70	2510,06±16,00
9	1597,95±73,06	*
10	2356,41±26,32	*
13	782,85±4,62	*
16	2307,20±222,20	2798,77±79,40
17	1572,37±150,96	2266,59±72,85
18	2629,33±160,63	2643,30±22,88
19	1785,01±156,27	2808,01±55,76
21	2150,33±168,79	2662,43±23,74
27	1740,42±142,25	2487,72±70,49
28	829,81±54,15	604,71±6,01

Tabela 28 (continuação): Valores obtidos para a atividade antioxidante (AA) para o método de ORAC e HORAC

	ORAC	HORAC
Amostra	AA ($\mu\text{mol CAET}/100\text{g}$)	AA ($\mu\text{mol CAET}/100\text{g}$)
31	1551,10 \pm 75,53	*
38	963,79 \pm 59,52	*
43	1251,97 \pm 71,02	*
45	1184,17 \pm 65,75	2156,88 \pm 56,73
49	2476,33 \pm 179,86	2853,25 \pm 140,00

*Não houve amostra em volume suficiente para efetuar a determinação

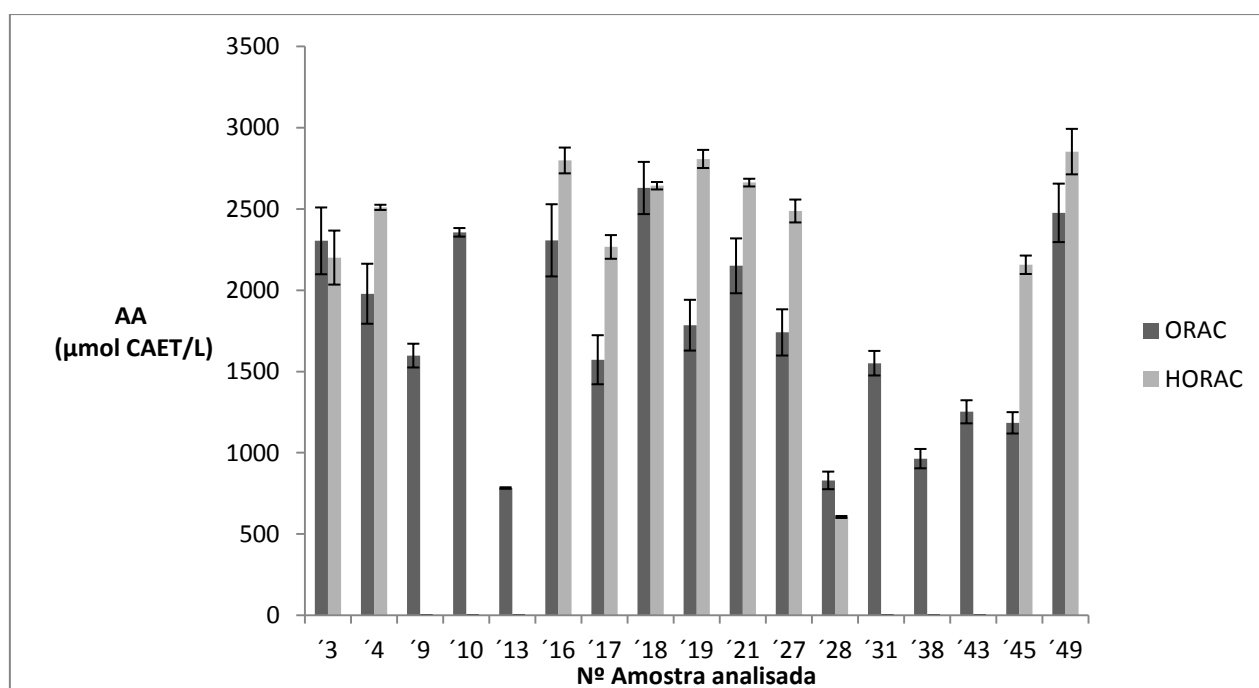


Figura 63: Teores obtidos para as diferentes amostras, com o método de ORAC e HORAC

Os resultados mostram que as amostras apresentam maior atividade antioxidante determinada pelo método de HORAC, exceto a amostra 28 (Broa 93), sendo a que também apresenta menor atividade antioxidante (604,71 $\mu\text{mol CAE}/100\text{g p.s.}$).

Na literatura encontram-se valores para a atividade antioxidante para algumas variedades de milho, sendo estas milho branco, vermelho e amarelo que apresentam

valores 19312, 19191 e 19180 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$ de amostra, respectivamente, pelo método de ORAC (Mora Rochin, *et al.*, 2010). No entanto, para as amostras analisadas pelo método de ORAC os valores da atividade antioxidante encontram-se compreendidos entre 782,85-2629,33 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{g p.s.}$

Por sua vez, tentou-se relacionar os valores obtidos na AA com as áreas dos compostos que apresentavam sinal no detetor ED e verificou-se que não existe qualquer tipo de relação entre eles. Isto pode ser devido ao fato de se terem utilizado extratos concentrados e como já foi referido, pode ter ocorrido perda de compostos nos extratos concentrados.

4.3 Comparação das amostras

De forma a correlacionar as diferentes amostras com todos os parâmetros analisados, elaborou-se o tratamento de resultados por componentes principais (Figura 64) recorrendo ao *software* NTSYS. No gráfico as amostras encontram-se pintadas de acordo com a sua cor e apresentam-se destacadas com um círculo da mesma cor, aquelas que têm a mesma proveniência. Consideraram-se 47 amostras, visto que as restantes 4 amostras em falta provocavam uma maior dispersão dos resultados, como tal não foram consideradas para elaboração do gráfico.

As variedades consideradas como estrangeiras, são as amostras que são consideradas como referência, nomeadamente a amostra 35 (BS22), tal como já foi referido ao longo da discussão do trabalho.

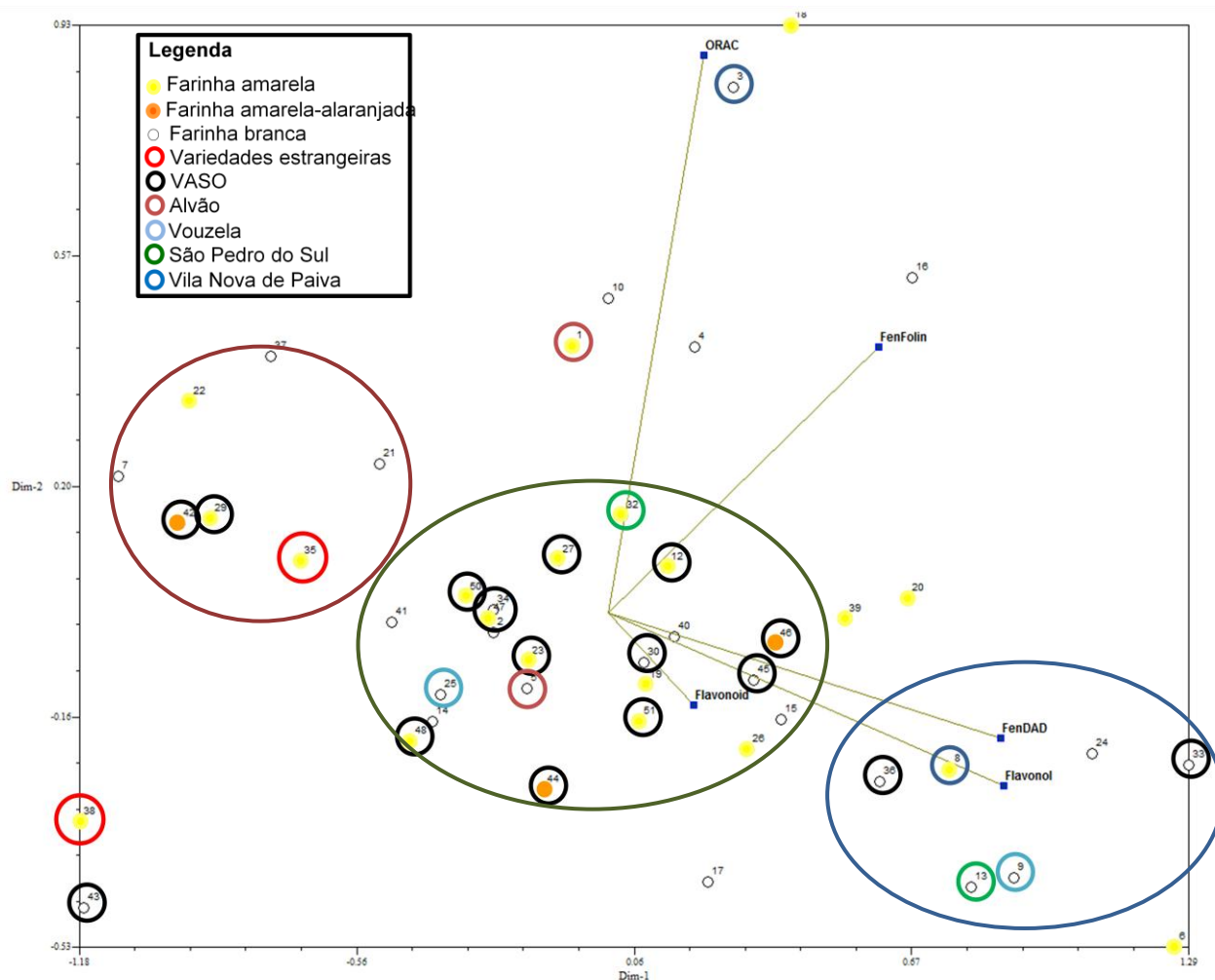


Figura 64: Projeção das amostras (47 amostras) e 4 variáveis em estudo (ORAC, teor de fenóis totais, flavonóides totais e flavonóis) no espaço definido pelos 2 primeiros componentes principais (variância total acumulada: 61,46%)

No que se refere à dispersão das amostras no espaço é visível que se considerar o parâmetro cor e proveniência, as amostras se encontram dispersas, indicando que não existe relação com estes dois parâmetros. A grande variabilidade dos resultados é devida à enorme diversidade de genótipos das amostras. Se forem considerados os teores de fenóis e flavonóides totais, os resultados parecem indicar que as amostras da bola azul se distinguem por apresentarem teores mais elevados de fenóis e flavonóis, surgindo em oposição as amostras de bola roxa, que apresentam teores

inferiores. O grupo discriminado a roxo, encontra-se mais relacionado com a amostra americana standardizada, BS22. Algumas amostras distinguem-se muito das restantes, nomeadamente a 3 (Broa 21 A), 4 (Broa 142), 10 (Broa 65), 16 (Broa 136), 18 (Broa 148), 38 (NDB) e 42 (CV 2004).

Por sua vez, trataram-se também os resultados considerando a área total dos picos correspondentes aos compostos voláteis analisados (nonanal, heptanal, hexanal, 2-nonenal (E), decanal, 2-heptenal). É visível pela análise da Figura 65 que há algumas amostras que se caracterizam por teores mais elevados destes compostos, como a amostra 8 (Broa 34), 9 (Broa 83), 33 (Pigarro 2009), 35 (BS22) e 47 (CX Estica 95).

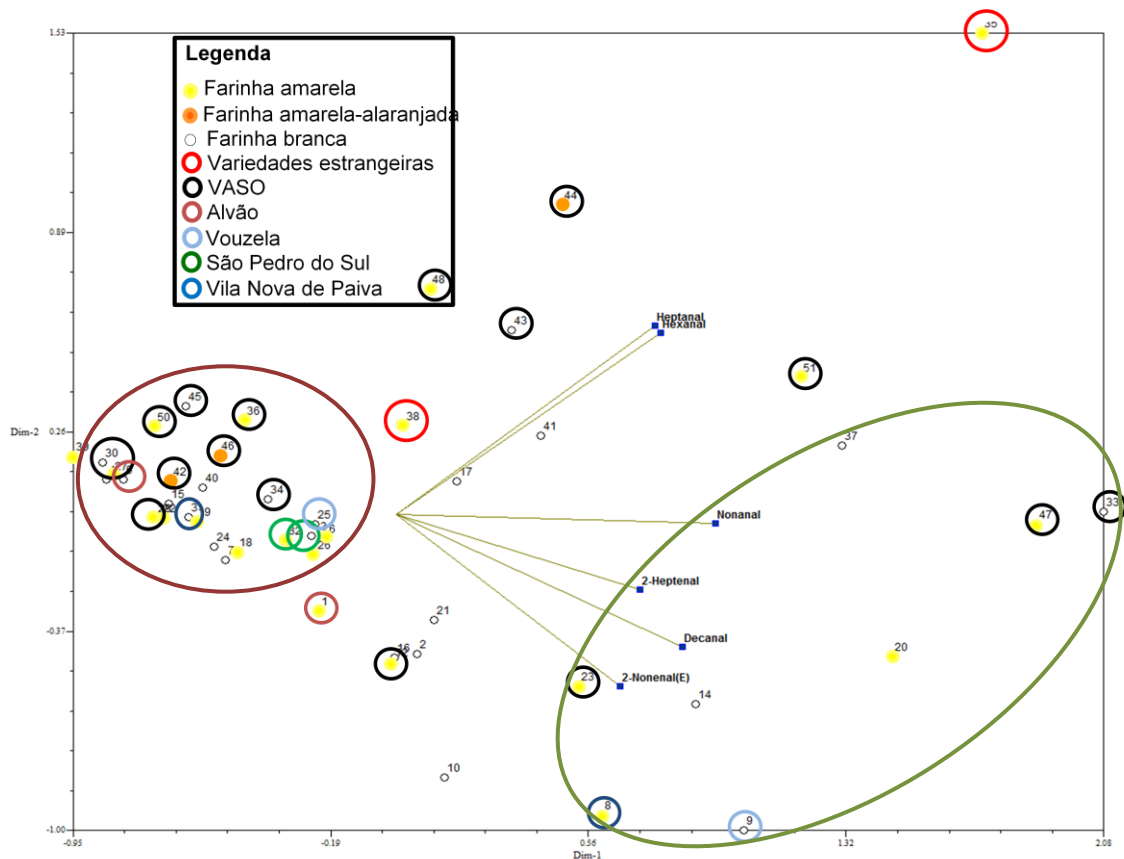


Figura 65: Projeção das amostras (47 amostras) e 6 variáveis em estudo (área individual de cada aldeído) no espaço definido pelos 2 primeiros componentes principais (variância total acumulada: 81,93%)

Agrupando as variedades: (i) diferentes variedades “Broa##”, que discriminam o número de campo da colheita, (ii) diferentes variedades “Amíudo” que apresentam o ciclo de seleção, (iii) diferentes variedades “Verdeal de Alperrela” (VA) e (iv) diferentes variedades “Castro Verde” (CV), tem interesse verificar o que ocorre nessas amostras de acordo com a variedade que apresentam. É também de interesse relacioná-las com a amostra BS22, que é uma amostra americana, como ponto de referência de uma variedade não portuguesa. Por sua vez, a amostra Bulk 1990/91 é uma amostra que à partida apresenta maior variabilidade, visto ser uma mistura de diversas variedades, tendo interesse também compará-la com as restantes. Tem também interesse comparar a amostra “Pigarro”(Pig) com as amostras que resultam do cruzamento desta com outra, como o “Pop45xpig” e “Fan06xPig”, bem como esta última com o “Fandando” (Fn2008).

A Figura 66 apresenta a área total de compostos voláteis para as diferentes variedades referidas, a Figura 67 corresponde ao teor de compostos fenólicos pelo método espectrofotométrico e a Figura 68, corresponde aos resultados da AA pelo método de ORAC. Para esta última, não foi possível estabelecer as mesmas relações, uma vez que não existem resultados para todas as amostras e considerou-se a amostra húngara NDB 1011, para termo comparativo. Atendendo a este fato, as amostras que foram consideradas, surgem na tabela referenciadas com “(2)”.

De forma a simplificar os gráficos, as barras foram coloridas consoante o número de amostra a que correspondem e a Tabela 29 apresenta o genótipo correspondente a cada número de amostra. A legenda das amostras encontra-se no gráfico.

Tabela 29: Nº de amostra referenciada nas Figura 66, Figura 67 e Figura 68, bem como o respectivo genótipo

Nº Amostra	Genótipo	Nº Amostra	Genótipo	Nº Amostra	Genótipo
2	Broa-172	22	Broa-48	44	CV 2009
3	Broa-21-A ⁽²⁾	25	Broa-70	46	CV C0S0 94
4	Broa-142 ⁽²⁾	26	Broa-164	33	Pigarro C009
6	Broa-209	28	Broa-93 ⁽²⁾	34	Pigarro C0 (C3) 08
8	Broa-34	32	Broa-213	37	Pop45xPig
9	Broa-83 ⁽²⁾	39	Broa-218	49	Fan06xPig ⁽²⁾
10	Broa-65 ⁽²⁾	40	Broa-217	50	Fan 2008
11	Broa-92	41	Broa-187	49	Fan06xPig
13	Broa-214 ⁽²⁾	12	Amiudo C0S084	21	Bulk 1990/91 ⁽¹⁾
15	Broa-57	27	Amiudo C0S003 ⁽²⁾	35	BS22 ⁽¹⁾
16	Broa-186 ⁽²⁾	29	Amiudo (C3) 97	38	NDB 1011 ⁽¹⁾
17	Broa-136 ⁽²⁾	31	Amiudo 2009 ⁽²⁾		
18	Broa-148 ⁽²⁾	43	VA 2003 ⁽²⁾		
19	Broa-113	45	VA 2009 ⁽²⁾		
20	Broa-102	42	CV 2004 (#50)		

(1) Amostras traçadas em linha horizontal, para estabelecer comparações

(2) Consideradas na Figura 68

Estudo de diferentes variedades de milho utilizadas na produção de Broa

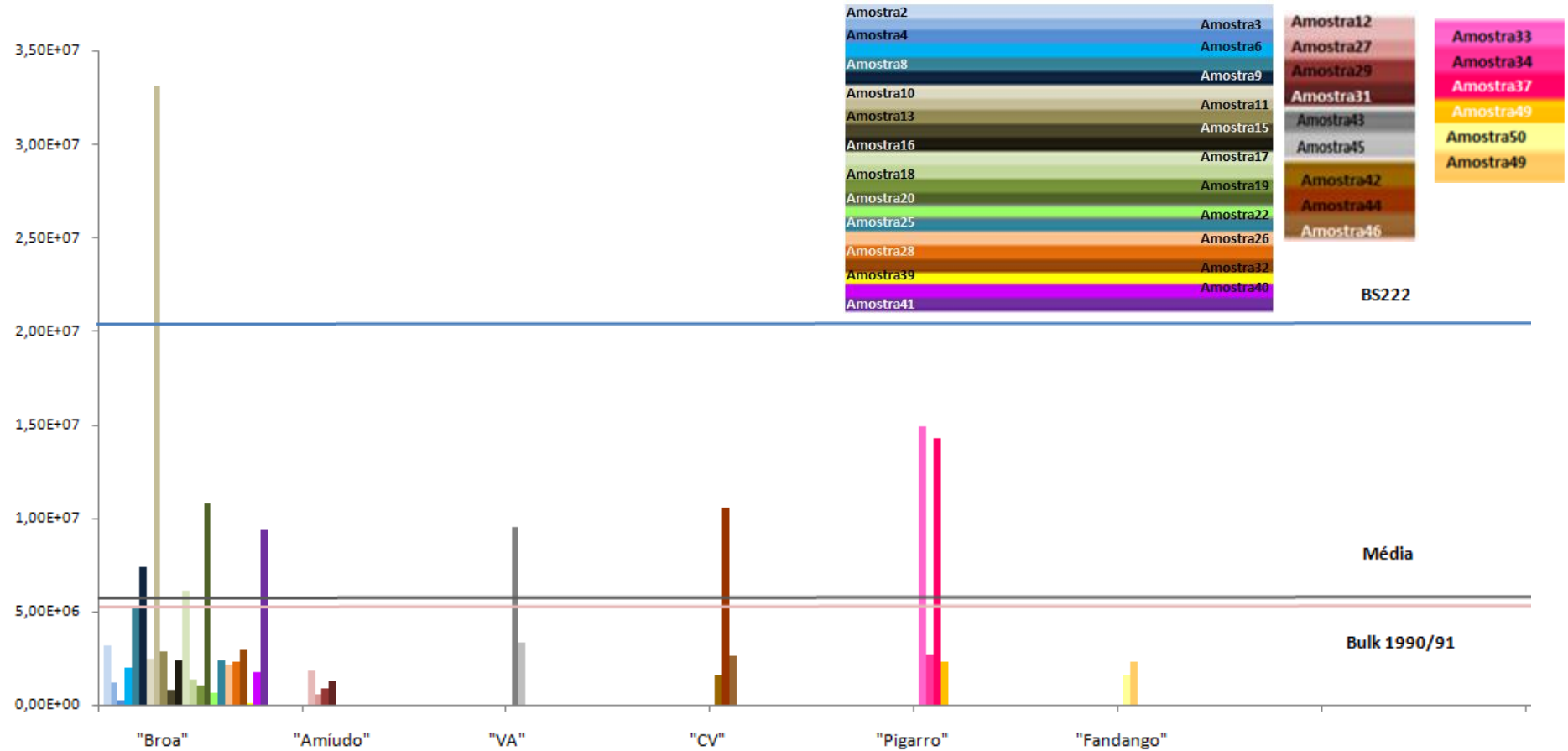


Figura 66: Área total de compostos voláteis obtida para as diferentes variedades (n=40): broa (n=23), amíudo (n=4), VA (n=2), CV (n=3), Pigarro (n=4) e Fandango (n=2) e comparação com a média total, variedade Bulk 1990/91 e variedade americana, BS22

Estudo de diferentes variedades de milho utilizadas na produção de Broa

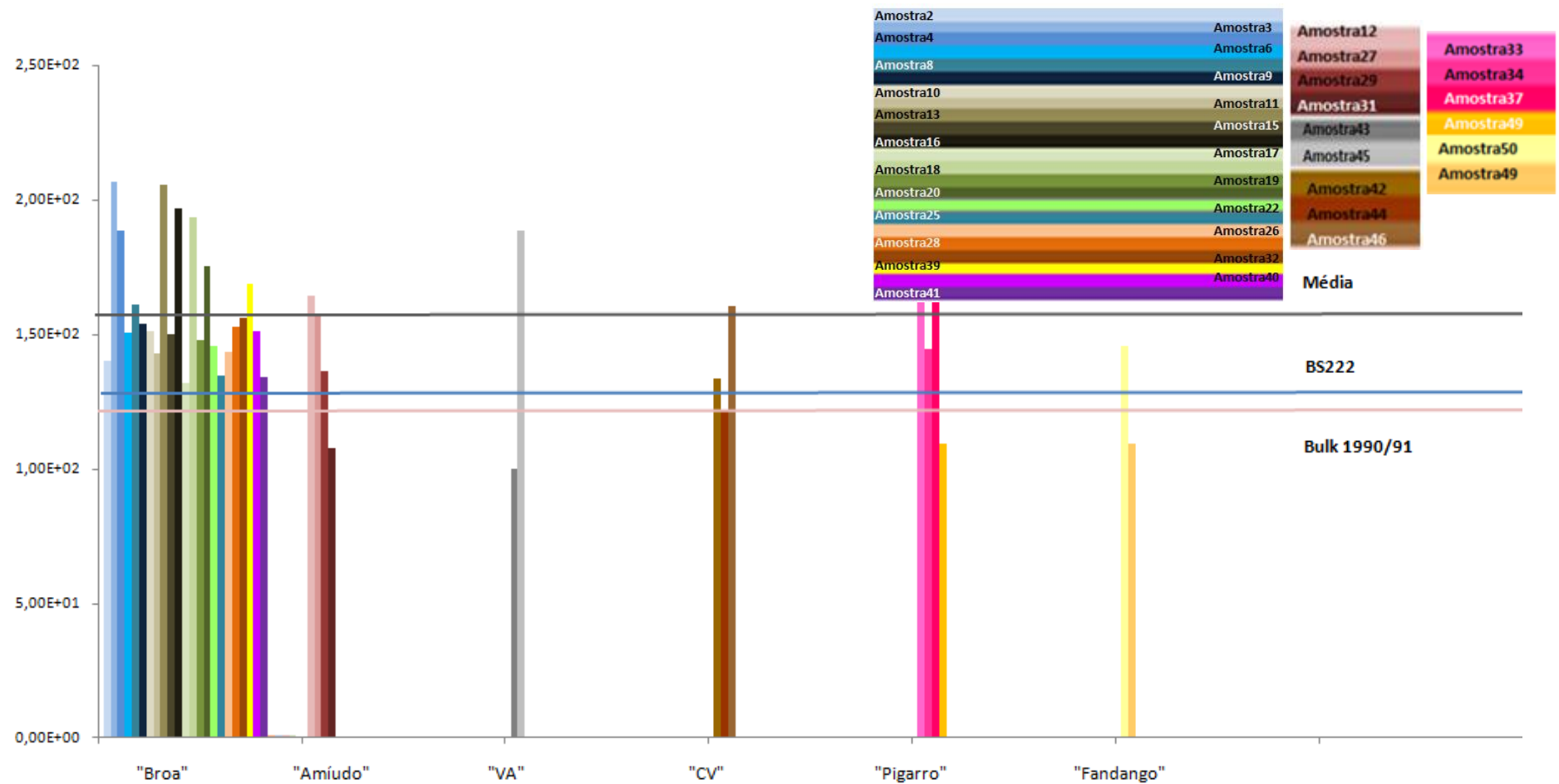


Figura 67: Teor de fenóis totais obtido para as diferentes variedades (n=40): broa (n=23), amíudo (n=4), VA (n=2), CV (n=3), Pigarro (n=4) e Fandango (n=2) e comparação com a média total, variedade Bulk 1990/91 e variedade americana, BS22

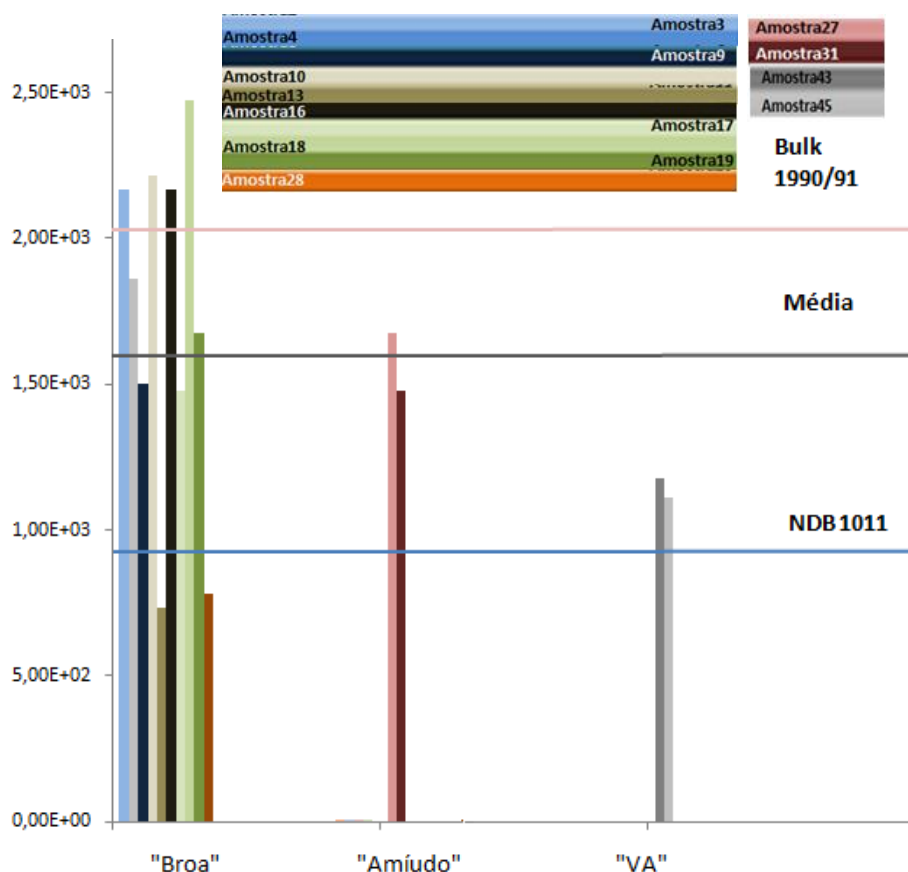


Figura 68: AA obtida para as diferentes variedades (n=14): broa (n=9), amíudo (n=2), VA (n=2) e comparação com a média total, variedade Bulk 1990/91 e variedade húngara NDB

Por análise da Figura 66 verifica-se que das diferentes variedades “broa” a que apresenta área mais elevada em compostos voláteis é a variedade 92. Em relação aos valores obtidos para o “Amíudo”, verifica-se que a variedade do ciclo de seleção de 84 apresenta área mais elevada, seguindo-se o ciclo de 2009. Esta característica não foi tida em conta nos critérios de seleção e este decréscimo no teor de compostos voláteis do ciclo de 1984 para 2009 poderá estar relacionado com algum fator agronómico. Assim, futuramente, a avaliação da qualidade deverá ser tomada em conta nos critérios de seleção.

Por sua vez, a variedade “Pigarro” (pig) do ciclo de seleção C009 é bastante semelhante à variedade resultante de um cruzamento da variedade “Pigarro” (Pop45xpig) e a variedade Pig COC308 com a variedade resultante do cruzamento entre

a “Pigarro” e a “Fandango” (Fan06xPig). Esta variedade resultante do cruzamento também apresenta características muito semelhantes com a variedade “Fandango”. Comparando as diversas variedades apresentadas com as variedades BS22 e Bulk 1990/91 verifica-se que a amostra americana (BS22) surge em destaque, sendo que as restantes variedades, comparativamente a esta amostra, apresentam menor área. A amostra Bulk, sendo uma mistura de diversas variedades, encontra-se num valor médio entre as áreas das diversas variedades.

Em relação à Figura 67, respeitante ao teor de fenóis totais verificou-se que, mais uma vez, entre as diferentes variedades, a variedade “Broa 92” é a que apresenta teor mais elevado em compostos fenólicos, seguindo-se a “VA”, nomeadamente a pertencente ao ciclo de seleção de 2009. A amostra americana encontra-se ligeiramente abaixo da média de teor de fenóis das amostras, mas não difere muito da maior parte das variedades, o mesmo se verifica para a amostra “Bulk#”. Assim, pode-se dizer que atendendo aos valores obtidos para os compostos fenólicos as amostras das variedades portuguesas apresentadas são comparáveis à amostra americana.

A Figura 68 compara as diversas variedades, para as quais existiam resultados e verifica-se, mais uma vez que uma das variedades “Broa” surge em destaque, sendo esta a variedade “Broa 148”, apresentando também uma AA acima da média e da obtida para a variedade “Bulk”. No entanto, os valores mais baixos foram obtidos para algumas variedades “Broa”, nomeadamente a Broa 214.

Assim atendendo aos parâmetros analisados e atendendo às diferentes variedades, são as variedades “Broa” que surgem em destaque nos valores obtidos para os compostos voláteis, fenólicos e para a AA.

4.4 Análise das amostras por HPLC-MS/MS

Com vista à identificação de compostos fenólicos presentes nas amostras de farinha de milho e à sua posterior quantificação, procedeu-se à análise por HPLC-MS/MS de um extrato de farinha de milho. Inicialmente o extrato foi analisado por infusão direta, no espectrómetro de massa. Fizeram-se ensaios de varrimento de massa (MS Scan) entre valores m/z 40 a 600. A amostra foi ionizada por “electrospray”

em modo negativo (ESI^-) e positivo (ESI^+). A partir de espectros de massa detetaram-se sinais de iões moleculares presentes na amostra. Na Figura 69 e Figura 70 apresentam-se os espectros resultantes dos ensaios em ESI^+ e ESI^- , respetivamente.

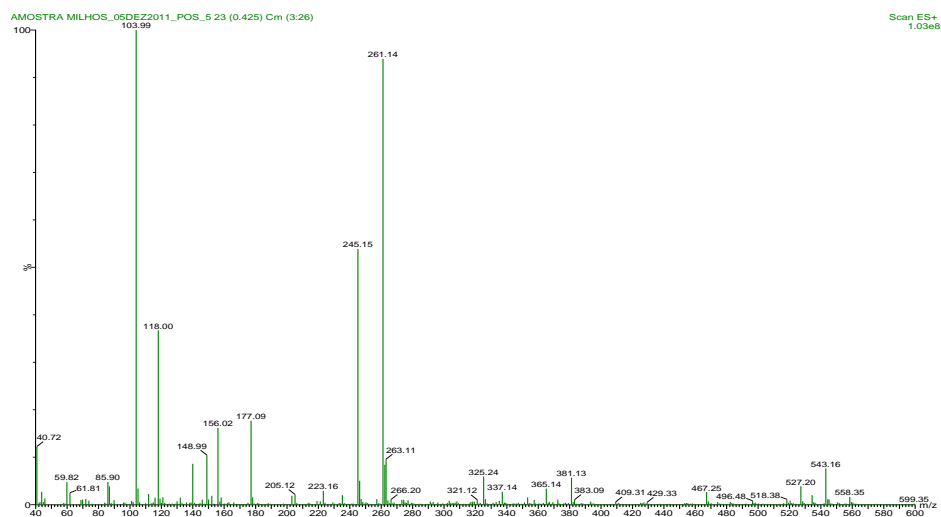


Figura 69: Espectro de Massa do extrato de farinha de Milho no modo MS Scan (m/z 40-600) em ESI^+ , após infusão direta

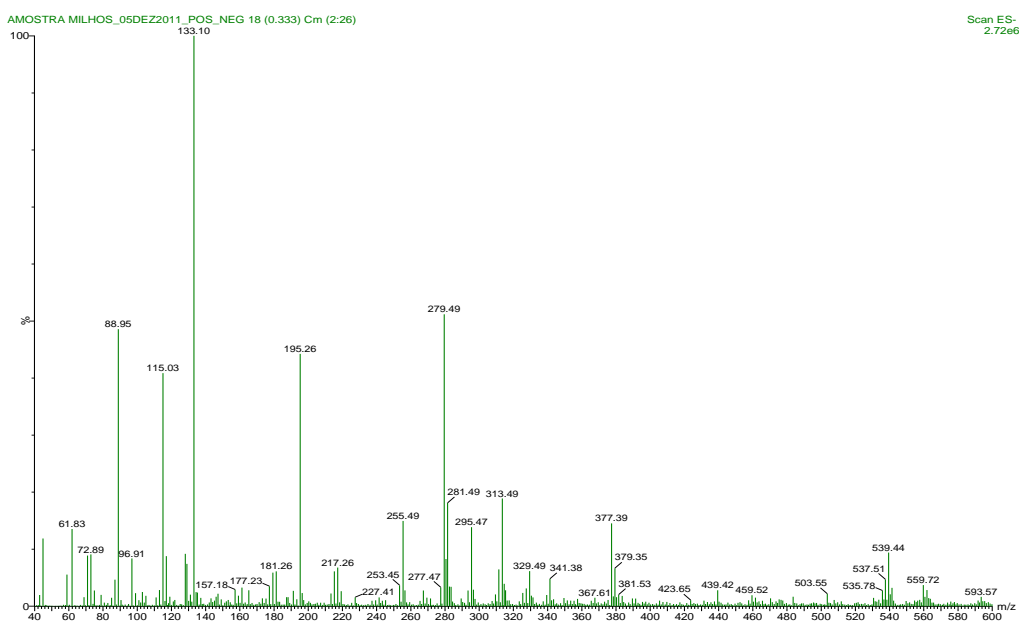


Figura 70: Espectro de Massa do extrato de farinha de Milho no modo MS Scan (m/z 40-600) em ESI^- , após infusão direta

A ionização por electrospray (ESI) é obtida por protonação $[M+H]^+$ ou desprotonação $[M-H]^-$ dos vários compostos da amostra. No processo de ionização pode ocorrer a formação de aductos por associação com iões como Na^+ , K^+ , NH_4^+ e Cl^- (ex. $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, (Murgu, 2002)). Assim, nos espectros de massa obtidos detetaram-se uma série de sinais de valor m/z no modo negativo (m/z 89, 115, 133, 195 e 279) que podem corresponder a iões moleculares ou aductos existentes na amostra e m/z 104, 118, 245, 261 no modo positivo.

No caso do espectro em modo positivo, verificou-se dois picos correspondentes a um aduto de sódio $[M + Na]^+$ e um aduto de potássio $[M + K]^+$ a 245 m/z e 262 m/z , respectivamente. A presença destes adutos foi confirmada por fragmentação. Atendendo à ausência de dados bibliográficos referentes a análise de milho por HPLC-MS/MS, foi necessário recorrer a várias etapas de análise, de forma a retirar a máxima informação possível referente aos compostos presentes na amostra.

Tendo em conta os valores de m/z detetados nos espectros anteriores por infusão direta (valores m/z mais intensos), estes iões foram pesquisados nos cromatogramas do extrato de farinha de milho, analisado por HPLC-MS/MS (Figura 71).

Optou-se por começar a trabalhar em modo negativo para a identificação dos compostos nas amostras de farinha de milho. Para cada pico detetado ao m/z detetado por infusão direta, foi determinado o seu c.d.o. máximo de absorção (Tabela 30). Compararam-se os espectros no modo de ião extraído ao m/z com os cromatogramas obtidos no detetor de díodos nos diferentes comprimentos de onda (Figura 71 e Figura 72).

06-Dec-2011 14:49:53 Amostra 11

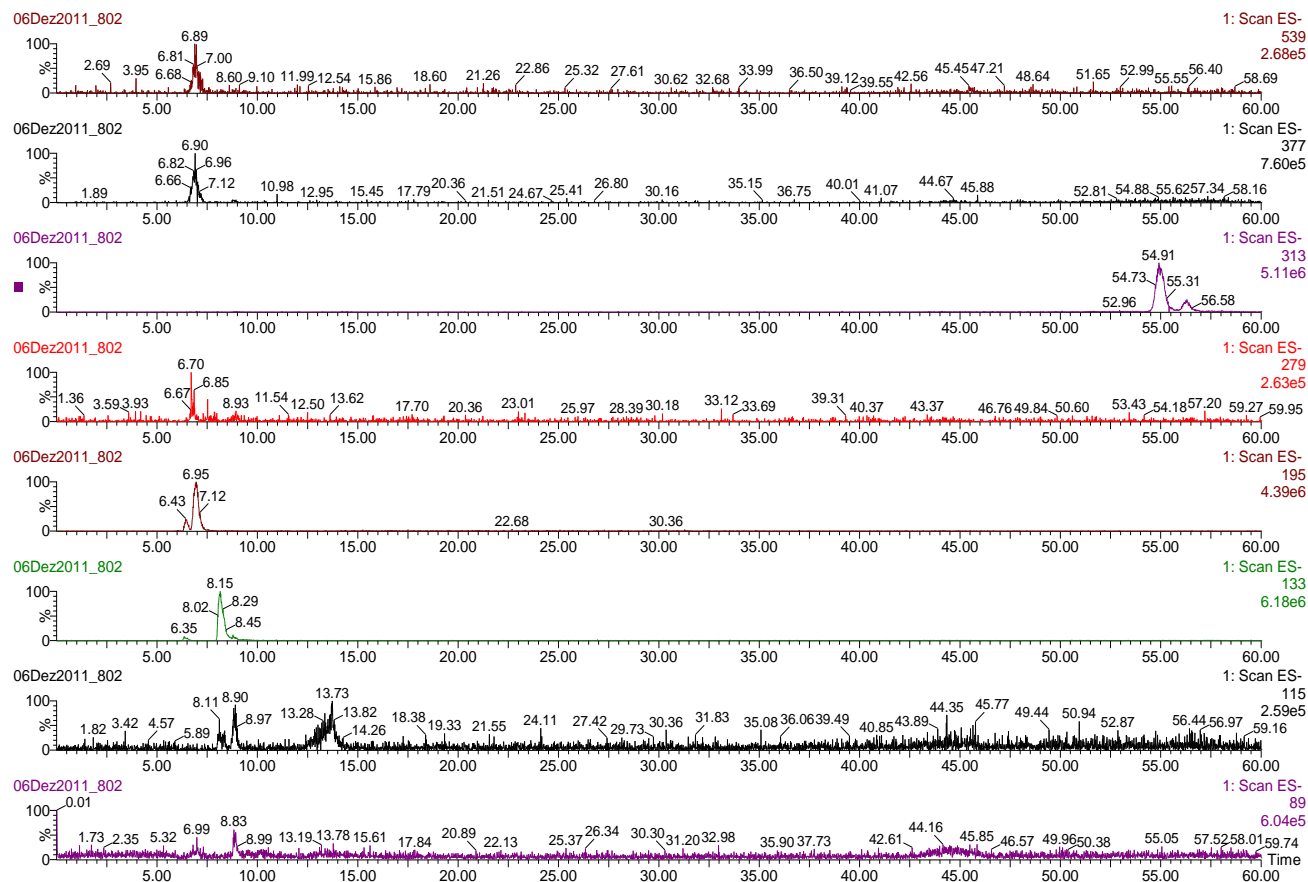


Figura 71: Cromatograma do ião extraído do extrato de farinha de milho (Amostra 11) em modo Scan ESI⁺

06-Dec-2011 14:49:53 Amostra 11

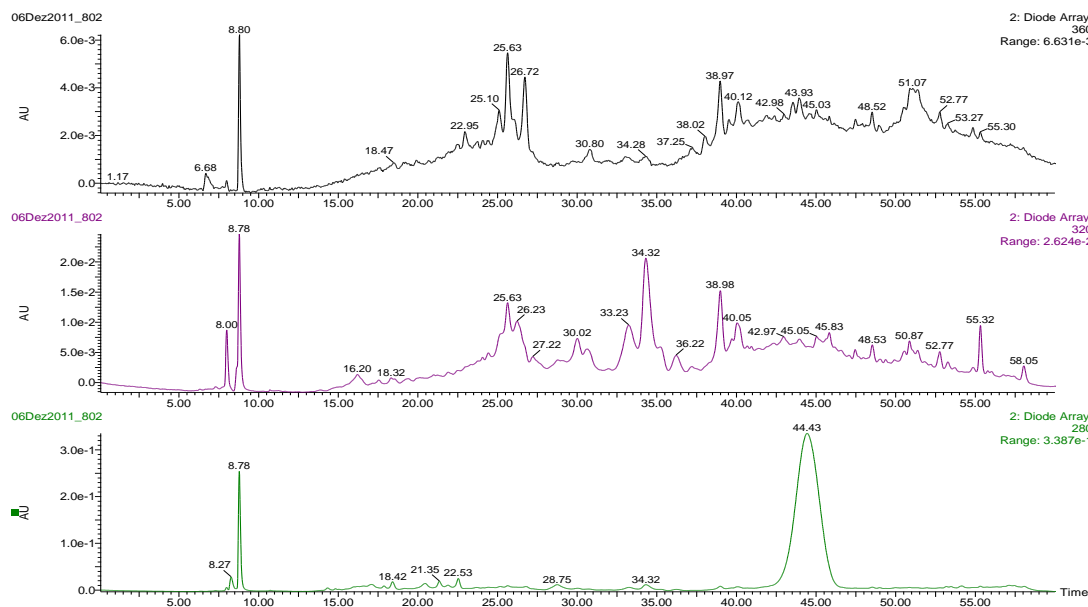


Figura 72: Cromatogramas obtidos no detector de díodos nos diferentes c.d.o para o extrato de farinha de milho

A Tabela 30 apresenta os valores de m/z de possíveis iões moleculares detetados, com os respetivos tempos de retenção e o c.d.o. máximo de absorção. Para picos pequenos, como no caso do ião molecular 195 é difícil retirar a informação relativa ao c.d.o.de absorção.

Tabela 30: Iões moleculares presentes na amostra de farinha de milho, bem como o tempo de retenção e c.d.o. máximo para cada ião

[M-H]⁻ (m/z)	Tr (min)	Cdo máximo (nm)
539	6.43+6.89	273
377	6.90	278
313	54.91	324
279	6.70+ 17.77	280
195	6.43+6.95	-
133	8.44	275
115	8.42++13.42	270
89	6.99+8.83	272

Considerando alguns iões moleculares em modo negativo, identificados por Arranz & Calixto (2010) num estudo realizado em farinha de trigo, estes foram usados como pista para uma possível identificação de compostos na farinha de milho e como tal foram pesquisados (Tabela 31).

Tabela 31: Iões moleculares pesquisados no extrato de farinha de milho, segundo Arranz&Calixto (2010) bem como a sua respetiva identificação

[M-H]⁻ (m/z)	Composto proposto
137	Ácido hidroxibenzóico
155	Ácido protocatechuico
163	Ácido <i>p</i> -cumárico
179	Ácido cafeico
193	Ácido ferúlico
223	Ácido sinápico

Tabela 31 (continuação): Iões moleculares pesquisados no extrato de farinha de milho, segundo Arranz&Calixto (2010) bem como a sua respetiva identificação

[M-H]⁻ (m/z)	Composto proposto
289	Epicatequina (-)
301	Ácido elágico
353	Ácido cafeoilquínico
367	Malvidina
377;163	Apigenina

Destes iões moleculares apresentados, foi possível detetar no extrato de farinha o ião molecular correspondente ao ácido ferúlico ([M-H]⁻ = 193 m/z), ácido *p*-cumárico ([M-H]⁻ = 163 m/z), ácido cafeoilquínico ([M-H]⁻ = 353 m/z), apigenina ([M-H]⁻ = 377 m/z), ácido sinápico ([M-H]⁻ = 223 m/z) e cafeico ([M-H]⁻ = 179 m/z). Os cromatogramas obtidos para estes iões moleculares estão apresentados na Figura 73.

No entanto, para ser confirmada a presença destes compostos deveriam ter sido feitos espectros de fragmentação destes valores de m/z. Aquando da análise das misturas padrão (Tabela 32) pesquisaram-se algumas transições correspondentes aos compostos e foi possível confirmar a presença da apigenina (191> 163 m/z), do ácido *p*-cumárico e do ácido cafeico, por apresentarem a transição que lhe é característica. Futuramente, os restantes compostos devem ser confirmados por MRM, como o ácido ferúlico, sinápico e cafeoilquínico.

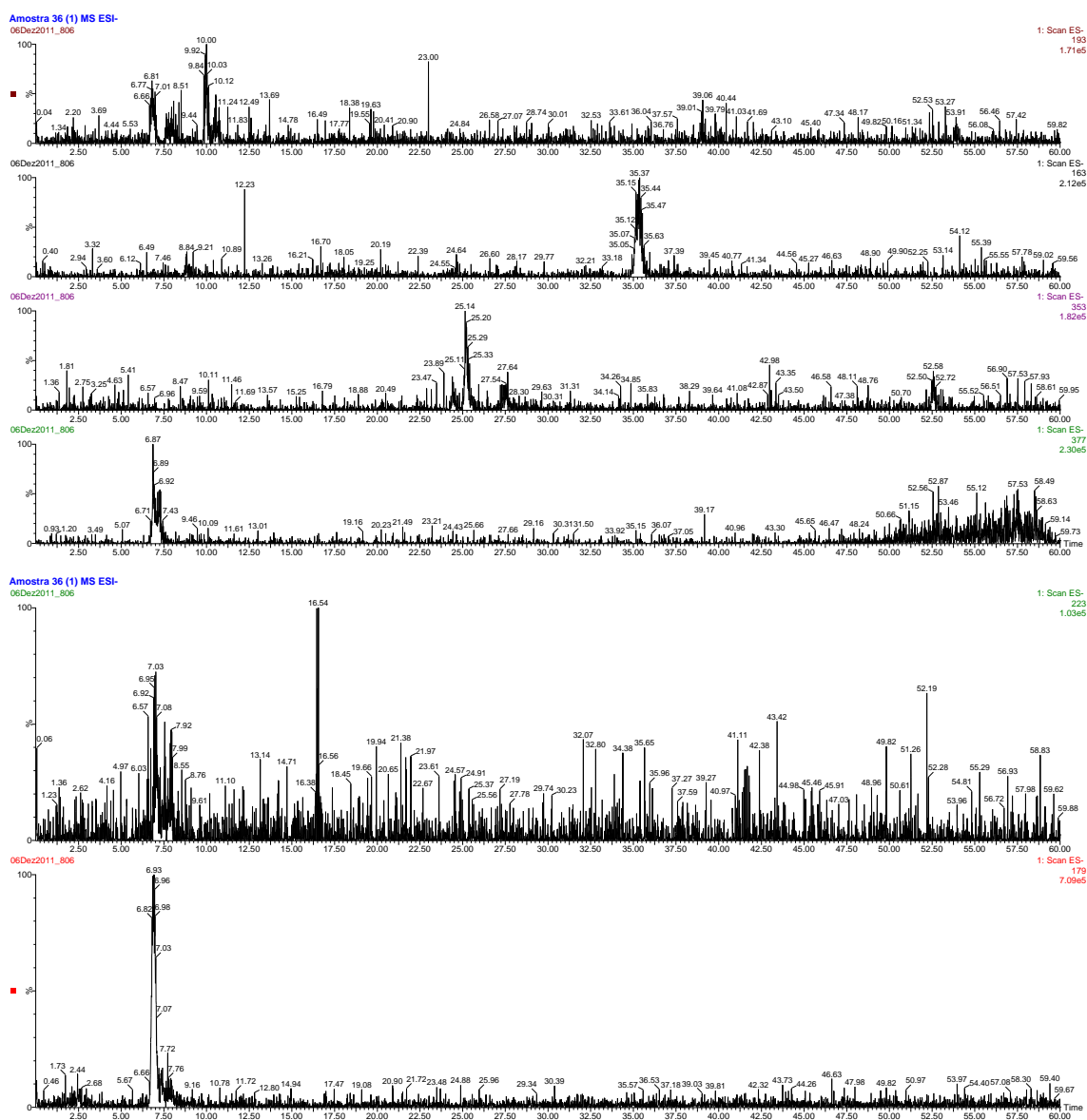


Figura 73: Cromatogramas dos iões extraídos do extrato de farinha de milho em modo Scan ESI, correspondentes aos iões pesquisados e detetados

Foram também analisados alguns padrões de compostos fenólicos sob condições idênticas para comparação direta com os resultados da amostra. Também foram efectuadas experiências de fragmentação com vista a uma identificação clara dos compostos na amostra. As Figuras 74 e 75 apresentam a sobreposição do perfil da amostra com o perfil obtido para os diversos padrões analisados a 280nm.

07-Dec-2011 04:09:04 Mix 1 (20ppm) MS ESI-

06Dez2011_814

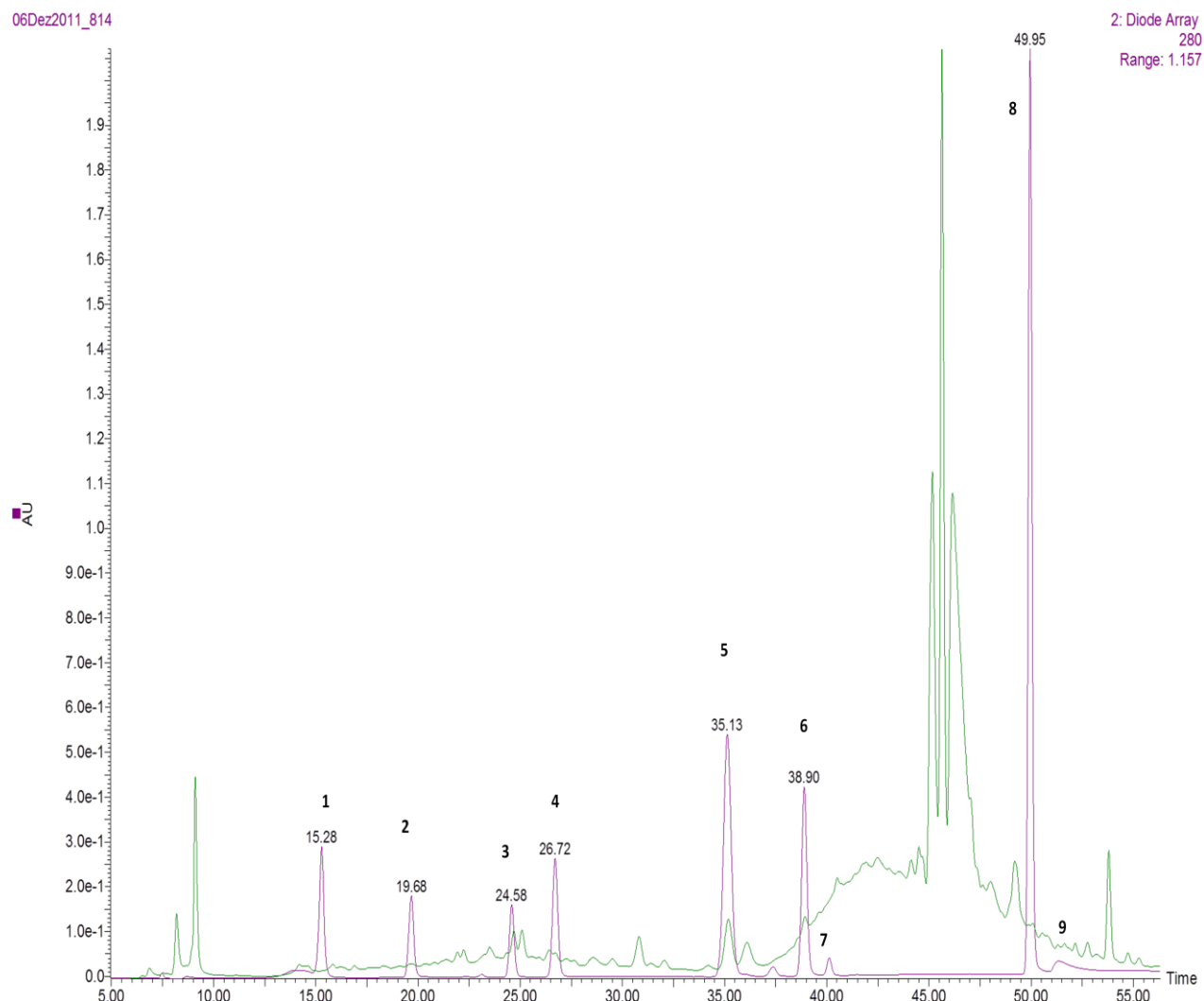


Figura 74: Sobreposição do perfil cromatográfico do extrato obtido por HPLC-DAD a 280nm e a mistura (mix) padrão 1 ; Legenda: 1-ácido gálico, 2- ácido protocatechuico, 3- ácido *p*-hidroxibenzóico, 4- ácido vanílico, 5-ácido cumárico, 6-Procianidina B2, 7- ácido ferúlico, 8- ácido cinâmico, 9- canferol

06-Dec-2011 22:00:40 Amostra 36 (2) MS ESI-

06Dez2011_808

2: Diode Array
280
Range: 2.075

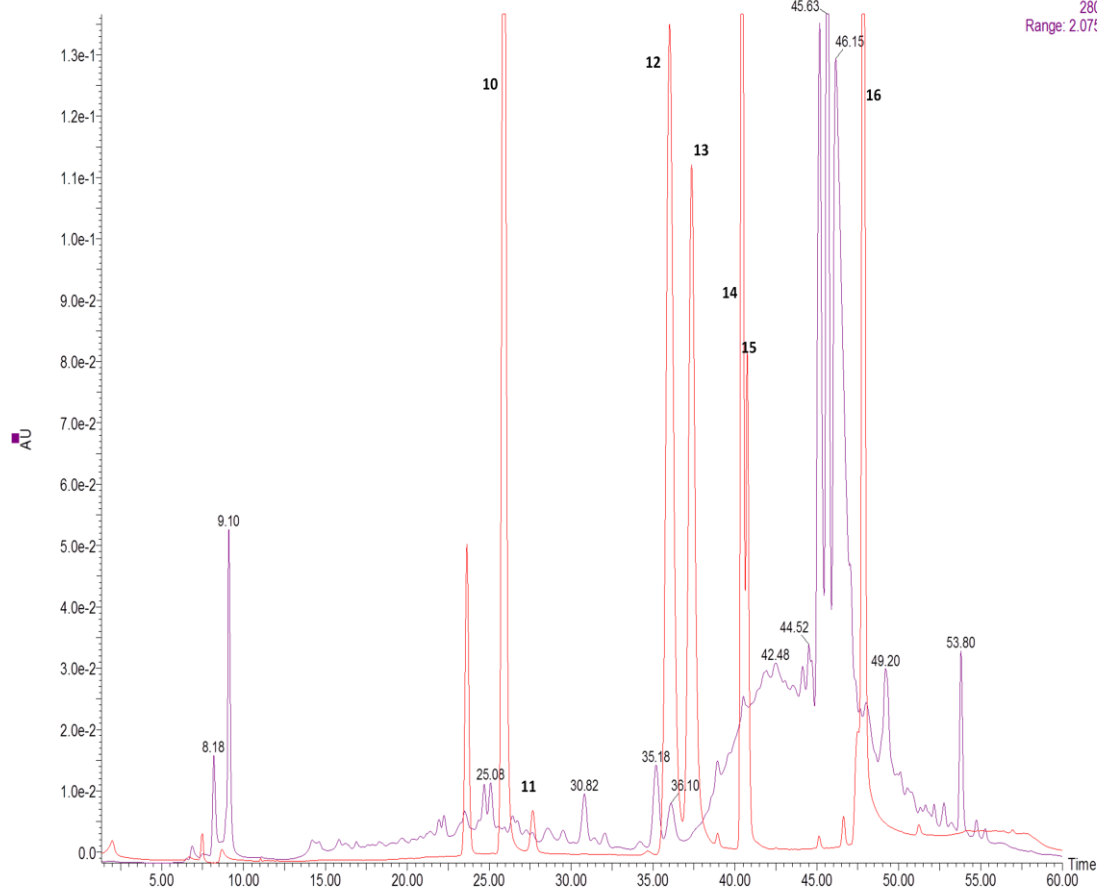


Figura 75: Sobreposição do perfil cromatográfico do extrato obtido por LC-DAD a 280nm e mistura (mix) padrão 2; Legenda: 10- ácido caféico, 11-vanilina, 12- siringaldeído, 13- Canferol-3-glucósido, 14- ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico, 15- quercetina, 16- hesperidina

Utilizou-se o modo de detecção MRM para a identificação de padrões e respectivos compostos na amostra. Na Tabela 32 apresentam-se as fragmentações correspondentes às transições para cada composto presente na mistura de padrões.

Tabela 32: Padrão correspondente a cada mistura padrão, bem como o tempo de retenção e as transições que apresentam

Mistura	Nº pico	Padrão	Tr (min)	MRM
Mix 1	1	Ácido gálgico	15.28	169>125
	2	Ácido protocatechuico	19.68	153>109
	3	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	24.58	137>93
	4	Ácido vanílico	26.72	(1)
	5	Ácido <i>p</i> -cumárico	35.13	163>119
	6	Procianidina B2	38.90	(1)
	7	Ácido ferúlico	40.00	193>134 (1)
	8	Ácido cinâmico	49.95	147>103
	9	Canferol	52.00	285>151
Mix 2	10	Ácido cafeico	25.90	179>135
	11	Vanilina	27.50	151>136
	12	Siringaldeído	36.02	181>166
	13	Canferol-3-Glucósido	37.35	447>284
	14	Ác. 3,4,5 trimetoxicinâmico	40.42	237>133
	15	Quercetina	40.75	301>151
	16	Hesperidina	47.83	609>301

(1) – Fragmentos que não foram pesquisados

A amostra foi analisada nas mesmas condições dos padrões. Na Figura 76 são apresentados cromatogramas referentes a algumas das transições detetadas e que permitem a identificação dos compostos na amostra.

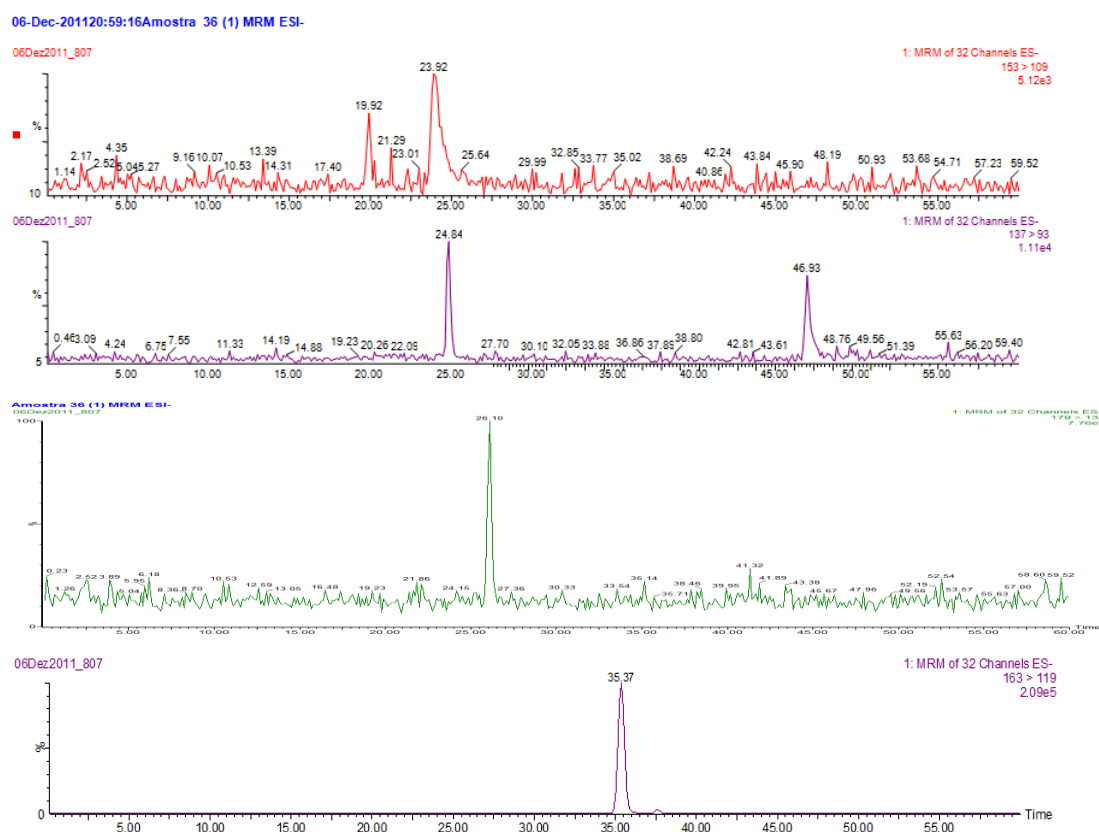


Figura 76: Cromatograma obtido em modo MRM na análise do extrato concentrado de farinha de milho (Amostra 36)

Assim confirma-se a presença, na amostra, de compostos que estavam presentes nas misturas padrão. A Tabela 33 apresenta os compostos que foram identificados no extracto de farinha de milho por HPLC-MS/MS.

Tabela 33: Compostos identificados no extrato de farinha, bem como o tempo de retenção e a transição que apresentam

Composto	Tr (min)	MRM (m/z)
Ácido protocatechuico	19.92+23.82	153>109
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	24.84+45.93	137>93
Ácido cafeico	26.10	179>135
Ácido <i>p</i> -cumárico	35.37	163>119

Por sua vez, verifica-se também que existem outros compostos com a mesma fragmentação, mas não apresentam o mesmo tempo de retenção que o verificado no padrão - suspeita-se que possam ser compostos da família ou conjugados. Não foi possível identificar mais compostos, provavelmente, por falta de sensibilidade, atendendo ao fato de serem ensaios preliminares, as condições utilizadas poderão não ter sido as mais adequadas, portanto futuramente, deverão ser otimizadas.

Esta análise permitiu assim confirmar a identificação de alguns compostos por HPLC-DAD. Estes compostos já foram referidos na bibliografia, como compostos presentes em farinhas de milho. Também na bibliografia surgem reportados compostos como o ácido vanílico, *p*- hidroxibenzóico e ferúlico, bem como a quercetina e hesperidina, os quais não foram pesquisados e/ou encontrados.

Para uma futura análise de amostras de farinha de milho, com vista a uma identificação mais completa e de forma a quantificar os compostos fenólicos presentes, justifica-se uma caracterização mais completa da amostra e para tal deverá se proceder a uma melhoria das condições de ionização e de fragmentação. Este estudo será um bom ponto de partida para futuros trabalhos com esta amostra.

5 Conclusões e trabalhos futuros

Amostras de farinha de milho foram analisadas com o objectivo de avaliar quais os compostos voláteis e fenólicos que estão presentes nas amostras em estudo no âmbito do projeto.

As condições experimentais foram otimizadas para a análise dos compostos voláteis, de forma a serem adaptadas às características da matriz e aumentarem a eficiência de extração. Concluiu-se que as melhores condições de análise correspondiam à preparação da amostra na proporção de 2g de farinha e adição de 3mL de água, seguido da concentração dos compostos com uma fibra de microextração constituída por DVB/CAR/PDMS, a uma temperatura de 60°C e com 60 minutos de tempo de exposição .

Foi possível identificar os compostos voláteis presentes nas amostras e concluiu-se que os que existiam em maior quantidade e com *flavour* associado, eram os aldeídos. Identificaram-se o hexanal, heptenal, 2-heptanal, nonanal, 2- nonenal (E) e decanal. O hexanal é o composto que apresenta maior teor, relativamente, aos outros compostos da mesma família.

Por análise dos perfis cromatográficos e áreas obtidas para estes compostos concluiu-se que a amostra 11 era a que apresentava uma intensidade mais elevada em aldeídos, comparativamente às restantes amostras. Esta amostra correspondia a uma variedade tradicional de milho (Broa 92) de cor branca e proveniente de Viseu.

Por sua vez, atendendo às características colorimétricas das amostras verificou-se que de uma maneira geral, as variedades brancas eram as que apresentavam maior intensidade em aldeídos, relativamente às restantes cores (amarela-alaranjada e amarela). No entanto, os resultados não eram significativamente diferentes.

Na análise das amostras verificou-se que estas estavam contaminadas por compostos do plástico da embalagem. Assim, em futuras amostragens as amostras deverão ser guardadas em frascos de vidro, de forma a evitar este tipo de contaminação.

Foi efetuada a otimização das condições de extração bem como a implementação de metodologias para análise dos teores totais em compostos fenólicos e flavonóides, bem como a análise cromatográfica (HPLC-DAD-ED) com vista à tentativa de identificação de compostos fenólicos e a sua quantificação. Concluiu-se que a melhor solução extratante para os fenóis das amostras, era a solução EtOH/H₂O (50%) e que ambas as quantidades, de massa de farinha (2g) e volume de extratante (20mL) permitiam obter picos bem definidos, bem como a quantificação pelo método de Folin Ciocalteu. Comparando os perfis cromatográficos nos diferentes c.d.o. (254, 280, 320 e 360 nm) concluiu-se que para tempos de retenção menores são detetados compostos que apresentam maior absorvância a 254nm (característico dos ácidos benzóicos) e que para tempos de retenção maiores, alguns compostos apresentavam área mais elevada a 320nm (ácidos cinâmicos). Por outro lado, a 360nm praticamente não são detetados picos, indicando que as amostras apresentavam baixos teores de flavonóis.

O teor em fenóis totais das diversas amostras foi quantificado pelo método de Folin Ciocalteu e por HPLC-DAD a 280nm e concluiu-se que o valor médio era de 206,83 mg eq AG/100g p.s. amostra, sendo a amostra 3 (Broa 21) a que se salientava relativamente à amostra de referência, BS22. De uma forma geral, verificou-se que as amostras apresentam variabilidade entre elas e que as que apresentavam maior teor em compostos fenólicos pertenciam a uma das variedades “Broa”. Os valores obtidos estão de acordo com os referenciados: 167,4mg AG/100g de peso seco (Mora Rochin, *et al.*, 2010). Agrupando as amostras pelas respetivas cores concluiu-se que as amostras da variedade branca, apresentavam maior teor em fenóis totais (154,85 mg eq AG/100g peso seco), comparativamente às outras variedades. No entanto, não se verificaram diferenças significativas entre elas. Foram também determinados os teores em flavonóides totais e concluiu-se que não existia correlação entre os valores obtidos para os flavonóides e fenóis totais. A amostra 14 (CMSPH6), foi a que apresentou maior teor (38,91mg eq catequina/100g p.s. amostra) em relação às restantes e à BS22.

Aquando da comparação dos valores obtidos espectralmente e por HPLC-DAD verificou-se que ocorriam variações elevadas entre os valores obtidos pelas duas técnicas e concluiu-se que à medida que o extrato era concentrado havia perda de compostos fenólicos. Este fator poderá ter influenciado todos os resultados que foram obtidos a partir do extrato concentrado. Em trabalhos futuros deverá ter-se em conta a concentração a efetuar ao extrato. Procedeu-se a uma tentativa de identificação de compostos fenólicos individuais por HPLC-DAD tendo sido identificados a vanilina, o ácido *p*-cumárico, ferúlico e o siringaldeído. Concluiu-se, que, de uma forma geral, o composto que se encontrava em maior concentração nas diferentes variedades de milho (brancas, amarelas e alaranjadas) era a vanilina. Dos compostos detetados, o ácido ferúlico juntamente com o ácido *p*-cumárico já foram reportados como responsáveis pela bioatividade, atividade antioxidante e anticarcinogénica no milho branco (Lopez Martinez, *et al.*, 2009). O ácido *p*-cumárico foi também identificado por HPLC-MS/MS, bem como o ácido protocatechuico e *p*-hidroxibenzóico e a apigenina. Na análise por HPLC-MS/MS foi detectada a presença de compostos que podem corresponder ao ácido ferúlico ($[M-H]^- = 193 \text{ m/z}$), cafeoilquínico ($[M-H]^- = 353 \text{ m/z}$) e sinápico ($[M-H]^- = 233 \text{ m/z}$). No entanto, para confirmar a presença destes compostos deverão ser feitos espectros de fragmentação MS/MS.

Atendendo aos resultados obtidos na fração de compostos fenólicos insolúveis, concluiu-se que em estudos futuros se deverá realizar ensaios de simulação de digestão, para avaliar se o efeito observado será igual, porque embora estes compostos se encontrem na forma insolúvel, estes quando ingeridos no alimento também são hidrolisáveis.

Na análise por HPLC-ED, detetaram-se 12 picos (compostos) que poderão estar relacionados com a atividade antioxidante, tendo sido só identificado o ácido ferúlico. Assim, atendendo aos objetivos do trabalho, estudos futuros devem ser realizados para identificar os compostos fenólicos presentes nas amostras de farinha com potencial antioxidante, recorrendo à técnica de HPLC-MS/MS. Deverá dar-se continuidade aos ensaios preliminares que foram efetuados neste trabalho e otimizar condições para a matriz em questão, o milho.

Na análise da atividade antioxidante pelo método de ORAC, os valores obtidos eram mais baixos do que os valores descritos na literatura. Este fato terá que ser avaliado e estudado. Por outro lado, com o método HORAC os valores obtidos eram ligeiramente superiores aos descritos na literatura.

Comparando as variedades, de uma maneira geral as variedades “Broa” surgem mais destacadas nos diversos parâmetros e de uma forma geral, também são equiparáveis à variedade americana BS22. Estes resultados, servirão de base ao desenvolvimento de sistemas de produção inovadores.

Com este trabalho foi possível identificar pontos críticos para obtenção de bons resultados em ensaios futuros, no que se refere à conservação das amostras e preparação e conservação de extractos.

6 Referências Bibliográficas

Abdel-Aal, E. S. M., Hucl, P. A., A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry*, 1999. 76: p. 350–354.

Adom, K. K., Sorrells, M. E., Liu, R. H., Phytochemical and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005. 53: p.2297–2306.

Adom, K. K., Liu, R. H., Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002. 50(21): p. 6182–6187.

Akapo, S. O. & McCrea, C. M. M., SPME-GC determination of potencial volatile organic leachables in aqueous-based pharmaceutical formulations packaged in overwrapped LDPE “vial”s. *J. of Pharmaceutical and biomedical analysis*, 2008. 47: p. 526-534.

Andreasen, M. F., Kroon, P. A., Williamson, G., Garcia-Conesa, M. T., Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *Journal of Agricultural Food Chemistry* , 2001. 49: p. 5679–5684.

Angelo, P. M. & Jorge, N., Compostos fenólicos em alimentos - Uma breve revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz*; 2007.66(1): p.232-240.

Arranz, S., Calixto, F. S., Analysis of polyphenols in cereals may be improved performing acidic hydrolysis: A study in wheat flour wheat bran and cereals of the diet. *Journal of Cereal Science*, 2010. 51:p.313-318.

Arteaga Llona, A., El índice glicémico.Una controversia atual. *Nutrición hospitalaria*, 2006. 21: p.55-60.

Arthur, C., Killam, L. M., Buchholz, K. D., Pawliszyn, K. D., Automation and optimization of solidphase microextraction. *Analytical Chemistry*, 1992. 64: p. 1960-1966.

Bailey, M. E.; Gutheil, R. A.; Hsieh, F. H.; Cheng, C. W.; Gerhardt, K. O.; Maillard reaction volatile compounds and color quality of a whey protein concentrate-corn meal extruded product. *Thermally Generated Flavors: Maillard, Microwave, and Extrusion Processes*; Parliment, T., H.; Morello, M., J., McGorin; R. J., Eds.; ACS Symposium Series 543; *American Chemical Society*: Washington, DC, 1994. p. 315-327.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., Phenolic compounds in plant and agri industrial by products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 2006. 99: p.191-203.

Barbieri, R., Casiraghi E. M., Production of a food grade flour from defatted corn germ. *Journal of Food Technology*, 1983.18:p.33-38.

Barrionuevo, W. R. & Lanças, F. M., Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. *Química Nova*, 2001. 24 (2): p. 172-175.

Bredie, W. L. P., Guy, R. C. E., Mottram, D. S., Aroma volatiles from the extrusion-cooking of model systems containing proline and ornithine. *Flavour Science: Recent Developments*; Taylor, A. J., Mottram, D. S., 1998. p. 221-224.

Brites, C., Trigo, M. J., Santos, C., Collar, C., Rossel, C.M., Maize-Based on Gluten- Free Bread: Influence of Processing Parameters on Sensory and Instrumental Quality. *Food Bioprocess Technol*, 2010. 3: p. 707-715.

Brites, C., Haros, M., Trigo, M. J., Islas, R. P., De tales harinas, tales panes. Granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica. León, A., E., - Rossel, C. M., Editores, 2007.

Brites, C., Trigo, M. J., Santos, C., Collar, C. & Rossel, C. M., Factores que influenciam as propriedades reológicas de farinhas de milho. *Proceedings 8º Encontro de Química dos Alimentos*, 2007 a. 609-612.

Broinizi, P. R. B., Andrade-Warh, E. R. S., Silva, A. M. O., Novoa, A. J. V., Torres, R. P., Azeredo, H. M. C., Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Cienc Tecnol Aliment*, 2007. 27 (4): p. 902-8.

Buttery, R. G., Ling, L. C., Stern, D. J., Studies on Popcorn Aroma and Flavor Volatiles. *J.Agric. Food Chemistry*, 1997. 45: p.837-843.

Callejón, R. M., Tesfaye, W., Torija, M. J., Mas, A., Troncoso, A. M. & Morales, M. L., Volatile compounds in red wine vinegars obtained by submerged and surface acetification in different woods. *Food Chemistry*, 2009. 113: p. 1252–1259.

Cartea, M. E., Francisco M., Soengas P. & Velasco, P., Phenolic Compounds in Brassica Vegetables. *Molecules*, 2011.16 (1): p. 251-80.

Cramer, A. C. J., Scott Mattinson, D., Fellman, J. K., Baik, B. K. *J. Agric Food Chem* ,2005. 53: p. 7526.

D'Archivio, M., Filesì, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R., Polyphenols, Dietary Sources and Bioavailability. *Ist Super Sanita*,2007. 43 (4): p. 348-61.

De la Parra, C., Serna, S. O., Liu, R. H., Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortilla and tortilla chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007. 55(10): p.4177–4183.

Degenhardt, J., Gershenzon, J., Demonstration and characterization of (E)-nerolidol synthase from maize: a herbivory-inducible terpene synthase participating in (3E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene biosynthesis. *Planta*, 2000. 210: p. 815–822.

Del Pozo-Insfran, D., Brenes, C. H., Saldivar, S., O. S., Talcott, S. T., Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays* L.) products. *Food Research International*, 2006. 39: p.696-703.

Desjardins, A. E., McCarthy, S. A., Milho, makka & yu mai: Early journeys of Zea mays to Asia, (<http://www.nal.usda.gov/research/maize>) 2004.

Dewanto, V., Wu, X., Liu, R. H., Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002. 50: p. 4959–4964.

Doebley, J. F., The genetics of maize evolution. *Annual Review of Genetics*, 2004. 38: p. 37-59.

Dórea, H. S; Gaujac, A., e Navickiene, S., Microextração em fase sólida: aspectos termodinâmicos e cinéticos. *Scientia Plena*, 2008. 4(7): p. 077201.

Escarpa, A., Gonzales, M. C., Optimization strategy and validation of one chromatographic method as approach to determine the phenolic compounds from different sources. *Journal of Chromatography A*, 2000. 897: p. 161–170.

Ettre, L. S., The beginning of headspace. *LGC North America*, 2002. 20(12): p. 1120–1129.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, 1993. [<http://www.Fao.org/docrep/T0395E/T0395E00.htm#contents>, consultado em Dezembro 2011].

FAOSTAT [<http://www.faostat.fao.org/>, consultado em 2011].

Faulds, C. B.; Williamson, G., The role of hydroxycinnamates in plant cell wall. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999. 79 (3): p.393-395.

Feet, R. & Troncoso, A. M., Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria*, 2004. 24(4): p. 691–693.

Fenaille, F., Visani, P., Fumeaux, R., Milo, C. & Guy, P. A. , Comparison of mass spectrometry-based electronic nose and solid phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry technique to assess infant formula oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003. 51:p. 2790–2796.

Ferguson, L. R., Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, 2001.465: p. 89-111.

Flavors & Fragrance, Featuring Naturals& Essential Oils, *Aldrich International Edition*, 2000.

Frova, C., Krajewski, P., Di Fonzo, N., Villa, M., Sari-Gorla, M., Genetic analysis of drought tolerance in maize by molecular markers. I. Yield components, *Theor. Appl. Genet.*, 1999. 99: p. 280–288.

Gao, L. W., Oomah, B. D., Mazza, G., Wheat quality: antioxidant activity of wheat millstreams. P. Ng, & C. W. Wrigley (Eds.), *Wheat quality elucidation*. St. Paul, MN: AACC International, AACC Press, 2002; p.233

Goffman, F. D., Bergman, C. J., Total phenolics and radical efficiency of rice bran extracts. *Rice technical workshop group meet*, 29, 2002.

Grosch, W., Lipid degradation products and flavour. *Food Flavours. Part A: Introduction*; Morton, I. D., MacLeod, A. J., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1982. p. 325-398.

Guth, H.; Grosch, W., Geruchstoffe von extrudiertem Hafermehl, veränderungen bei der Lagerung (Aroma compounds from extruded oat flour, changes during storage). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1993.196: p. 22-28.

Halliwel, B., Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovascular Research*, 2007. 73(2):p.341–347.

Harmon. A. D., Flavor, Frangance and Odor Analyses; Marsili, E., (ed). Marcel Dekker, 2001. p. 75-106.

Haros, M., Tolaba, M., Suárez, C., Influence of corn drying on its quality for the wet-milling process. *Journal of Food Engineering*, 2003. 60: p. 177-184.

- Hassimotto, N. M. A., Genovese, I. M., Lajolo, F. M., Antioxidant activity of dietary fruits vegetables and commercial frozen fruit pulps. *J Agric Food Chem*, 2005. 53 (8): p. 2928-3.
- Heim, K. E., Taigliaferro, A. R., Bobilya, D. J., Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002. 13: p. 572–584.
- Heiniö, R. L., Katina, K., Wilhelmson, A., Myllymäki, O., Rajamäki, T., Latva-Kala, K., et al. , Relationship between sensory perception and flavour-active volatile compounds of germinated, sourdough fermented and native rye following the extrusion process. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 2003. 36:p. 533–545.
- Heinonen, I. M., Lehtonen, P. J. & Hopia, A. I., Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998. 46: p.25–31.
- Hogan, A. G., Gillespie, G. T., Kocuturk, O., O'Dell, B. L. & Flynn, L. M., The percentage of protein in corn and its nutritional properties. *J. Nutr.*, 1955. 57: p. 225-239.
- Högnadóttir, A. & Rouseff, R. L., Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography–olfactometry and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2003. 998: p. 201–211.
- Holguín-Acuña, A. L., Cavajal-Millán, E., Santana-Rodríguez, V., Rascón-Chu, A., Márquez-Escalante, J. A., León-Renova, N. E., Gastelum-Franco, G., Maize bran/oat flour extruded breakfast cereal: A novel source of complex polysaccharides and an antioxidant. *Food Chemistry*, 2008. 111: p. 654-657.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L., The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005. 53: p.1841–1856.

Hwang, H. I.; Hartman, T. G.; Karwe, M. V.; Izzo, H. V.; Ho, C. T., Aroma generation in extruded and heated wheat flour. *Lipids in Food Flavors*; Ho, C.-T., Hartman, T. G., Eds.; ACS Symposium Series 558; *American Chemical Society*: Washington, DC, 1994. p. 144-157.

Incze, J., Lengyel, T., Ure, A. M., Compendium of Analytical Nomenclature. Definitive Rules, 1997. *The Orange Book*, 3rd ed., 1998. Blackwell Science: Oxford.

Jacobsen, C., Hartvigsen, K., Lund, P., Meyer, A. S., Adler-Nissen, J., Holstborg, J., et al., Oxidation in fish oil-enriched mayonnaise. *European Food Research and Technology*, 1999. 210: p.13-30.

Jaganath, I., B. & Crozier, A., Dietary Flavonoids and Phenolic Compounds. Plant Phenolics and Human Health. *Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*, John Wiley & Sons, Inc., 2010.

Javanmardi, L., Stushnoff, C., Locke, E., Vivanco, J. M., Antioxidant activity and total phenolic contents of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*, 2003. 83: p. 547–550.

Karakaya, S., Bioavailability of phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 2004. 44 (6): p.453-464.

Kaseleht, K., Leitner, E., Paalme, T., Determination aroma-active compounds in kama flour using SPME-GC/MS and GC-olfactometry. *Flavour and Fragrance Journal*, 2010.

Kataoka, H., Lord, H., L., Pawliszyn, J., Applications of solid phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 2000. 880: p.35-62.

Kim, H. K., et al., Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, 2006. 95 (3): p.466-473.

Klensporf, D. & Jelén, H. H., Analysis of volatile aldehydes in oat flakes by SPME-GC/MS. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2005. 14 (4): p. 389-395.

Klensporf, D. & Jelén, H. H., Effect of heat treatment on the flavor of oat flakes. *J. Cereal Sci.*, 2008. 48: p.656-661.

Köllner, T. G., Schnee, C., Gershenzon, J., Degenhardt, J., The sesquiterpene hydrocarbons of maize (*Zea mays*) form five groups with distinct developmental and organ-specific distributions. *Phytochemistry*, 2004. 65: p. 1895-1902.

Krist, S., Stuebiger, G., Bail, S. & Unterwger, H., Analysis of volatile compounds and triacylglycerol composition of fatty seed oil gained from flax and false flax. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2006. 108: p. 48–60.

Liu, J., Wang, C., Wang, Z., Zhang, C., Lu, S., Liu, J., The antioxidant and free-radical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (*Zea mays* L.) and related flavone glycosides. *Food Chemistry*, 2011. 126: p. 261-269.

Lopez Martinez, L. X., Oliart-Ros, R. M., Valerio-Alfaro, G., Lee, C. H., Parkin, K. L., Garcia, H. S., Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of egihteen strains of Mexican maize. *LWT – Food Science and technology*, 2009. 42: p.1187-1192.

Luthria, L. D., Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. *Food Chemistry*, 2008. 107: p.745-752.

Mahajan, S. S., Goddik, L. & Qian, M. C., Aroma compounds in sweet whey powder. *Journal of Dairy Science*, 2004. 87: p. 4057–4063.

Majcher, M. & Jelén, H. H., Comparison of suitability of SPME, SAFE and SDE methods for isolation of flavor compounds from extruded potato snacks. *J.of Food Composition and Analysis*, 2009. 22: p. 606-612.

Marinova, E. M., Yanishlieva, N. V., Inhibited oxidation of lipids II: Comparison of the antioxidative properties of some hydroxy derivatives of benzoic and cinnamic acids. *Fett-Wissenschaft Technologie, Leinfeldem-Echterdingen*, 1992. 94(11): p.428-432,

Mata, A. R., Nelson, D. L., Afonso, R. J., C. F., Gloria, M. B. A., Junqueira, R. G., Identificação de compostos voláteis da cúrcuma empregando microextração por fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* , 2003. 24(1): p.151-157.

Mira, N. V. M., Barros, R. M. C., Schiocchet, M. A., Noldin, J. A., Lanfer-Marquez, U. M., Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, 2008. 28 (4): p. 994-1002.

Miyazaki, M. & Morita, N., Effect of heat-moiture treated maize starch on the properties of dough and bread. *Food Research International*, 2005. 38: p. 369-376.

Mohsen, S., Ammar, A., Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chemistry*, 2009. 112: p. 595-598.

Moltenberg, E. L., Magnus, E. M., Bjorge, J. M., Nilsson, A., Sensory and chemical studies of lipid oxidation in raw and heat-treated oat flours. *Cereal Chem.*, 1996. 73: p.579-587.

Mondello, L., Casilli, A., Tranchida, P. Q., Dugo, P. & Dugo, G., Comprehensive two-dimensional GC for the analysis of citrus essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 2005. 20: p. 136-140.

Morales, M. L., González, G. A., Casas, J. A. & Troncoso, A. M., Multivariate analysis of commercial and laboratory produced Sherry wine vinegars: Influence of acetification and aging. *European Food Research and Technology*, 2001. 212: p. 676–682.

Mora Rochin, S., Gutiérrez-Urbe, J. A., Serna-Saldivar, S. O., Sánchez-Peña, P., Reyes-Moreno, C., Milán-Carrillo, J., Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. *Journal of Cereal Science*, 2010. 52: p. 502-508.

Moreira, P. M., Participatory maize breeding in Portugal. A Case Study. *Acta Agronomica Hungarica*, 2006. 54(4): p.431-439.

Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., et al. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*, 2001. 72 (2): p. 145-71

Naczki, M. & Shahidi, F., Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 2006. 41: p. 1523-1542.

Naczki, M. & Shahidi, F., Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr A*, 2004. 1054 (1/2): p. 95-111.

Neff, W. E., Warner, K. & Byrdwell, W. C., Odor significance of undesirable degradation compounds in heated triolein and trilinolein. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 2000. 77:p. 1303–1313.

Nongonierma, A. et al., Mechanisms of extraction of aroma compounds from foods, using adsorbents. Effect of various parameters. *Food Reviews International*, 2006. 22 (1): p. 51-94.

NP 4399:2000: Milho. Determinação do teor de água (sobre grãos moídos e sobre grãos inteiros), C410 / CT 41, (1ª Edição) IPQ.

Oliveira, A. C., Valentim, I. B., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., Barros, M. P., Mano, C. M., Goulart, M. O. F., Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. *Food Chem*, 2009. 115 (2): p. 469-75.

Oliveira, M. S., Badiale-Furlong E., Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. *World Mycotoxin Journal*, 2008. 2 (1): p. 1-10.

Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A. & Deemer, E. K., Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *J. Agric. Food Chem.*, 2002. 50: p.3122-3128.

Paradiso, V. M. , Summo, C., Pasqualone ,A., Caponio F.,Evaluation of different natural antioxidants as affecting volatile lipid oxidation products related to off-flavours in corn flakes. *Food Chemistry*, 2009. 113: p.543-549.

Parejo, F., Bastida, J., Codina, C., Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the analysis of antioxidative phenolic compounds in fennel using a narrow bore reversed phase C18 column. *Analytica Chimica Acta*, 2004. 512: p. 271–280.

Park, D. & Maga, A. J., Identification of key volatiles responsible for odour quality differences in popped popcorn of selected hybrids. *Food Chemistry*, 2006. 99: p.538-545.

Pedreschi, R. & Cisneros-Zevallos, L.,Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays* L.).*Food Chemistry*, 2007. 100: p. 956-963.

Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005.53 (12): p.5036,5040.

Pfannhauser, W., Fluchtige Verbindungen aus Extrudaten von Triticale (Volatile compounds from extruded triticale). *Dtsch.Lebensm.-Rundsch*, 1990. 86: p. 69-72.

PHEROBASE:[<http://www.pherobase.com/database/kovats/kovatsindex.php>, consultada em 2011].

Pinho, O., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Santos, L.H.M.L.M., Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. *J. Chromatography*, 2006. 1121 (2): p.145-153.

Pires Valente, A. L. & Augusto, F., SPME, SOLID PHASE MICRO-EXTRATION. Fundamental aspects of Solid Phase Micro-Extraction (SPME) are discussed in the present paper. The application of SPME as a microtechnique of sample preparation for gas chromatographic analysis is considered and related to existing theoretical models. Both research prototypes and commercial SPME devices are considered. *Química Nova*, 2000.23(4): p. 523-530.

Queiroz, S. C. N., Determinação multirresíduos de pesticidas em água por cromatografia líquida de alta eficiência com ênfase em espectrometria de massas e novos sorventes para fase sólida. Tese de Doutorado em Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

Reiners, J. & Grosch, W., Odorants in virgin olive oils with different flavor profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998. 46: p. 2754–2763.

Rocha, J. M., Brás, A. M., Trigueiros, J. J. B. L., Malcata, F. X, Pão de milho: caraterização de Produto Tradicional e Melhoramento Tecnológico. Escola Superior de Biotecnologia, UCP, Porto, 2003. 75.

Roginsky, V. & Lissi, E. A., Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 2005. 92:235-254.

Rondini, L., Peyrat-Maillard, M. N., Marsset-Baglieri, A. & Berset, C., Sulfated ferulic acid is the main in vivo metabolite found after short-term ingestion of free ferulic acid in rats. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2002. 50:p. 3037–3041.

Rooney, L. W. & Serna-Saldivar, S. O., Food use of whole corn and dry –milled fractions. White, P. J. & Jonson, L.,A., editors. Corn: Chemistry and Tecnology. 2ª ed. Inc. St. Paul, Minnessota, *American Association of Cereal Chemists*,2003.p. 495-536.

Ruiz, J. A., Quilez, J., Mestres, M., Guasch, J. Solid phase microextraction method for headspace analysis of volatile compounds in bread crumb; 2003. *Cereal Chemistry*. 80: p. 255-259.

Schnee, C., Köllner, T.G., Gershenzon, J., Degenhardt, J., The maize gene terpene synthase 1 encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (E)-farnesene, (E)-nerolidol, and (E; E)- farnesol after herbivore damage. *Plant Physiology*,2002. 130: p. 2049–2060.

Serra, A. T., Matias, A. A., Frade, R. F. M., Duarte, R. O., Feliciano, R. P., Bronze, M. R., Figueira, M. E., Carvalho, A., Duarte, C. M. M., Characterization of traditional and exotic Apple varieties from Portugal Part 2. – Antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of functional Foods* 2, 2010. p.46-53.

Shahid, F., Alasalvar, C., Liyana-Pthirana, C., Antioxidant Phytochemicals in Hazelnut Kernel (*Corylys avellana*, L.) and hazelnut by products. *J Agric Food Chem*, 2007. 55 (4): p. 4705-12.

Siddhuraju, P. & Becker, K., Antioxidant properties of various extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* lam.) leaves. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2003. 51: p. 2144-2155.

Sides, A., Robards, K., Helliwell, S., Changes in the volatile Profile of Oats Induced by processing. *J. Agric. Food Chem.*, 2001. 49: p.2125.

Silva, E. M., Souza, J.N. S., Rogez, H., Rees, J. F., Larondelle, Y. , Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, 2006. 101(3): p. 1012–1018.

Singleton, V. L., Rossi, J. A., Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J Enol Vitic*, 1965. 16 (3): p. 144-58.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R., M., Analysis of total phenols and other oxidant substrates and antioxidants by means of folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 1999.299:p.157-178.

Smitha, R. L., Cohenb, S. M., Doullc, J., Ferond, V. J., Goodman, J. I., Marnettf, J. L., Portogheseg, P. S., Waddellh, W. J., Wagneri, B. M., Hallj, R. L., Higleyk, N.A., Lucas-Gavinl, C., Adamsm, T. B., "A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils". *Food and Chemical Toxicology*, 2005.43(3): p. 345–363.

SOLIBAM [<http://www.solibam.eu>, consultado em 2011].

Swain, T., Hillis, W. E., The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolics constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1959. 10: p. 63–68.

Takahashi, Y. K., Nagayama, S. & Mori, K., Detection and masking of spoiled food smells by odor maps in the olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 2004. 24:p.8690–8694.

Tian, S., Nakamura, K., Kayahara, H., Analysis of phenolic compounds in white rice, brown rice and germinated brown rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004. 52 (15): p. 4808-4813.

Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., Polasky, S., Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature International Weekly Journal of Science*, 2002. 418: p. 671-677.

Triqui, R. & Guth, H., Potent odorants in “Smen”, a traditional fermented butter product. *European Food Research and Technology*, 2001. 212: p. 292–295.

Valente, A. L. P. & Augusto, F., SPME, SOLID PHASE MICRO-EXTRATION. Fundamental aspects of Solid Phase Micro-Extraction (SPME) are discussed in the present paper. The application of SPME as a microtechnique of sample preparation for gas chromatographic analysis is considered and related to existing theoretical models. Both research prototypes and commercial SPME devices are considered. Microextração por fase sólida, 2009.

Valim, M. F., Rouseff, R. L. & Lin, J., Gas chromatographic-olfactometric characterization of aroma compounds in two types of cashew apple nectar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003. 51: p. 1010–1015.

Vaz Patto, M. C., Moreira, P. M., Almeida, N., Satovic, Z., Pego, S., Genetic diversity evolution through participatory maize breeding in Portugal. *Euphytica*, 2008.161: p.283-291.

Vaz Patto, M. C., Moreira, P. M., Carvalho, V., Collecting maize (*Zea mays* L. convar mays) with potential technological ability for bread making in Portugal. *Genet. Resour Crop Evol*, 2007. 54: p. 1555-1563.

Vaz Patto, M. C., Alves, M. L., Almeida, N. F., Santos, C., Mendes Moreira, P., Satovic, Z., Brites, C., Is the Bread making technological ability of portuguese traditional maize landraces associated with their genetic diversity?. *Maydica*, 2009. 54: p. 297-311.

Vékey, K., Mass Spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *J. Chromatogr.*, 2001. 921: p.227.

Viegas, M. C. & Bassoli, D. G., Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-Innowax. *Química Nova*, 2007. 30 (8).

Wampler, T. P., Flavor, Fragrance and odor Analyses; Marsili, E., (ed). Marcel Dekker, 2001. p. 24-54.

Watson, S. A., Structure and Composition. Chemistry and Technology. *American Association of Cereal Chemists*. Watson, S.,A., Ramstad R.,E., Editores, 1991. p.53-82.

Yang, X. & Peppard, T., Solid-phase microextraction for flavor analysis. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 1994. 42: p. 1925-1930.

Zhou, K. & Yu, L., Effects of extraction solvent on the wheat bran antioxidant activity estimation. *LWT*, 2004. 37: p. 717-721.

Zitka, O., Sochor, J., Rop, O., Skalickova, S., Sobrova, P., Zehnalek, J., Beklova, M., Krska, B., Adam, V., Kizek, R., Comparison of Various Easy-to-Use Procedures for Extraction of Phenols from Apricot Fruits. *Molecules*, 2011. 16 (4): p. 2914-36.

Sebio, L., Efeito de alguns parâmetros operacionais de extrusão nas propriedades físico-químicas da farinha de inhame (*Dioscorea rotundata*) Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1996. p.106.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Maize>, em www.wikipédia.pt , consultado em Dezembro 2011.

Anexo I- Amostras em estudo

Cor das amostras

Tabela a: Parâmetros da cor obtidos para cada amostra de farinha de milho estudada, bem como a respetiva cor observada

Amostra	Parâmetros da cor obtidos pelo iluminante D65			Cor observada
	Cor (L*)	Cor (a*)	Cor (b*)	
1	85,3	-1,75	29,54	Amarelo
2	84,56	0,57	12,27	Branco
3	87,38	0,6	10,21	Branco
4	85,41	0,49	12,42	Branco
5	86,69	0,26	11,75	Branco
6	83,73	-0,19	25,36	Amarelo
7	87,02	0,55	11,02	Branco
8	83,86	-0,69	26,54	Amarelo
9	85,24	0,34	11,8	Branco
10	86,29	0,62	11,33	Branco
11	82,52	-0,51	14,16	Branco
12	84,65	-1,1	31,31	Amarelo
13	85,02	0,99	11,18	Branco
14	86,76	0,65	11,11	Branco
15	86,83	0,4	11,66	Branco
16	86,19	0,53	12,71	Branco
17	85,91	0,47	13,13	Branco
18	84,08	-0,83	30,57	Amarelo
19	84,22	-0,77	27,51	Amarelo
20	82,73	-0,84	20,69	Amarelo
21	86,81	-0,09	13,46	Branco
22	84,04	-0,8	28,41	Amarelo
23	85,14	-0,89	29,85	Amarelo
24	86,59	0,48	11,58	Branco
25	86,81	0,22	12,74	Branco
26	83,85	-0,29	27,92	Amarelo
27	85,4	-0,98	30,67	Amarelo
28	86,57	-0,65	26,56	Amarelo
29	85,41	-1,06	30,97	Amarelo
30	85,46	0,27	12,26	Branco
31	84,5	-0,27	31,41	Amarelo
32	86,53	-1,48	26,6	Amarelo
33	84,31	0,69	10,16	Branco
34	86,65	0,58	10,26	Branco
35	85,21	-0,79	25,57	Amarelo

Tabela a (continuação): Parâmetros da cor obtidos para cada amostra de farinha de milho estudada, bem como a respectiva cor observada

	Parâmetros da cor obtidos pelo iluminante D65			
Amostra	Cor (L*)	Cor (a*)	Cor (b*)	Cor observada
36	85,92	-0,76	22	Amarelo
37	88,34	0,11	11	Branco
38	86,35	-1,54	27,4	Amarelo
39	84,25	-0,59	28,62	Amarelo
40	85,83	-0,3	16,41	Branco
41	88,98	0,06	9,85	Branco
42	84,34	-0,03	33,55	Amarelo-alaranjado
43	87,23	0,4	11,84	Branco
44	82,6	0,1	34,6	Amarelo-alaranjado
45	86,43	0,13	10,27	Branco
46	82,91	0,38	36,2	Amarelo-alaranjado
47	85,34	-1,63	28,43	Amarelo
48	84,38	-1,47	27,97	Amarelo
49	86,33	-1,17	27,17	Amarelo
50	86,41	-1,11	24,9	Amarelo
51	84,49	-0,49	29,96	Amarelo

Anexo II- Compostos Voláteis

Estudo da composição de diferentes fibras- ensaios em branco

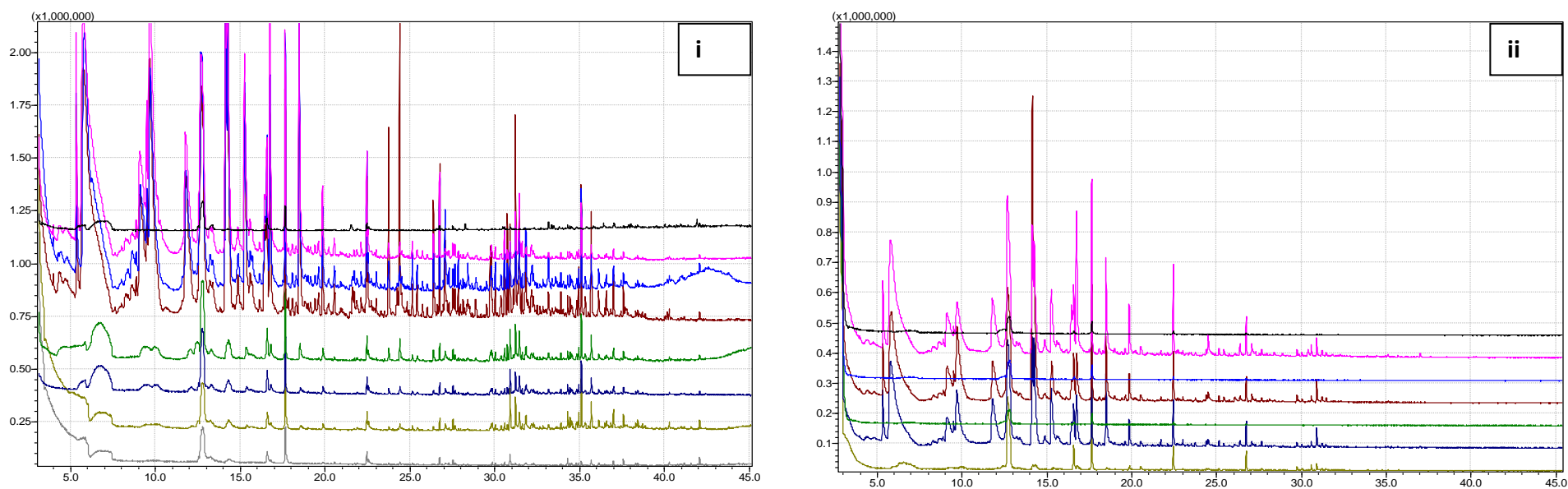


Figura a: Comparação dos perfis cromatográficos obtidos com a fibra de DVB/CAR/PDMS: i- branco da fibra condicionada durante 10min a 270°C, ensaio 1 amostra (ens), ens2, ens3, branco da fibra com 1.30min de dessorção, branco 2, branco da fibra com 5min de dessorção e branco com temperatura do injetor a 260°C; ii- branco da fibra condicionada 20min a 270°C, ens 1, branco da fibra condicionada 10 min a 270°C, ens2, branco da fibra condicionada 10min a 270°C, ens3, branco final

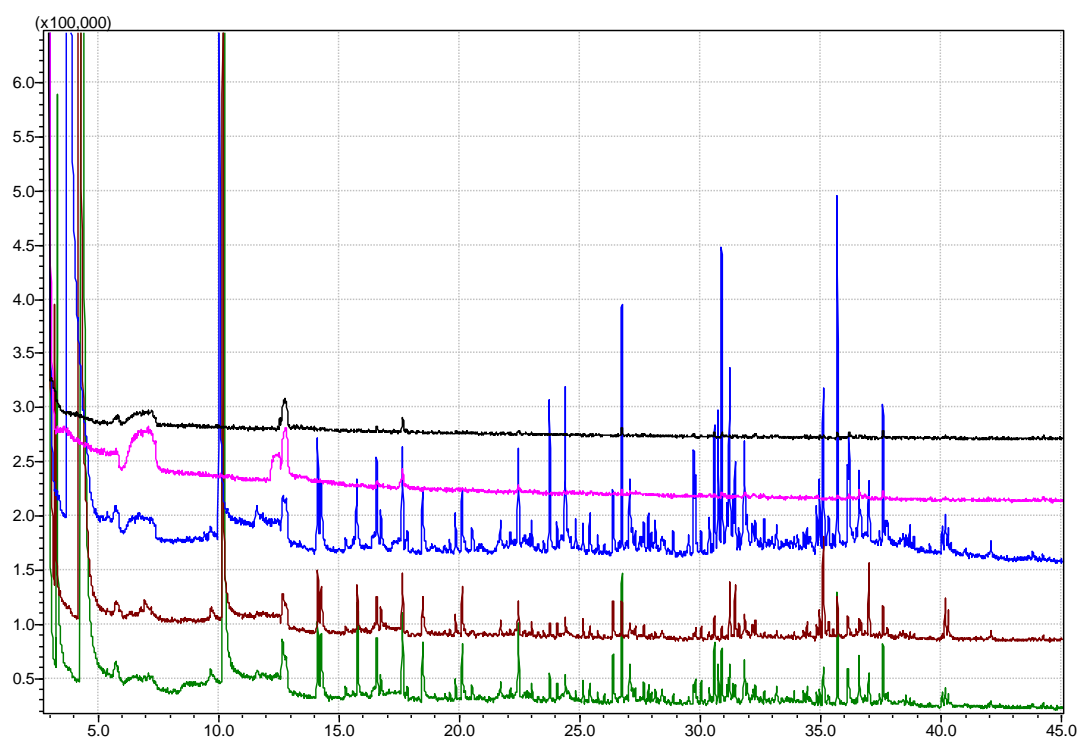


Figura b: Comparação dos perfis cromatográficos obtidos com a fibra de PDMS: branco da fibra condicionada durante 30min a 250°C, **branco após ensaios**, **ens 1**, **ens 2**, **ens3**

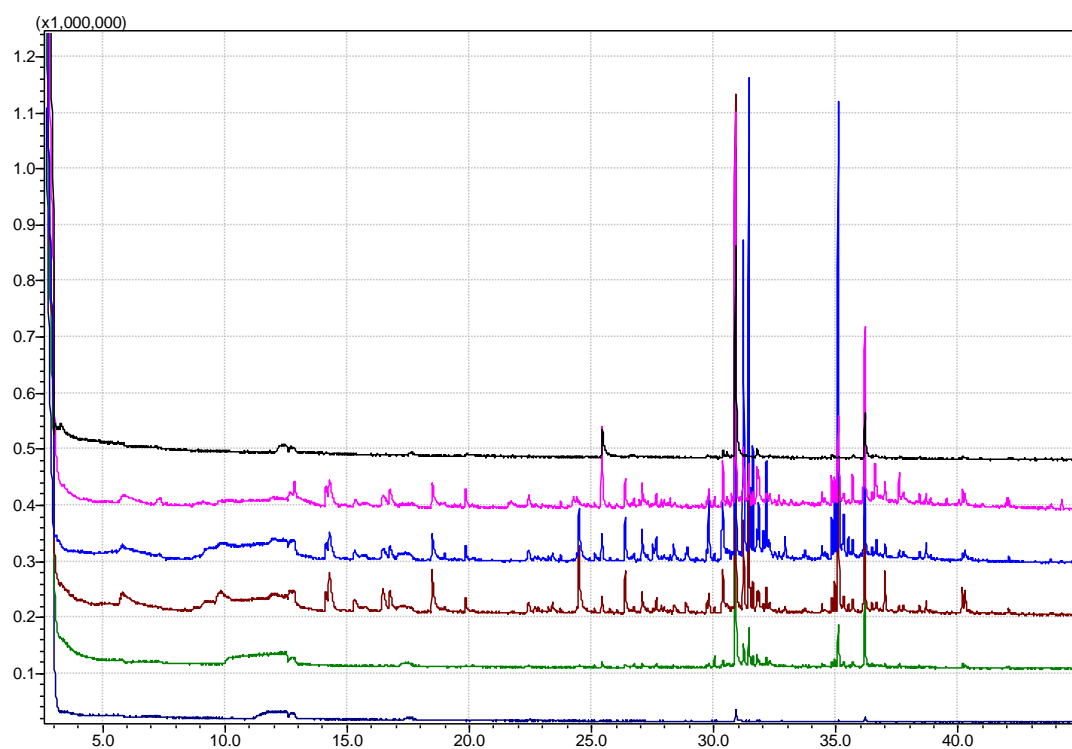


Figura c: Comparação dos perfis cromatográficos obtidos com a fibra de PA: branco da fibra condicionada durante 1h a 280°C, **ens1**, **ens2**, **ens3**, **branco com H₂O**, **branco da fibra condicionada durante 10min a 280°C**

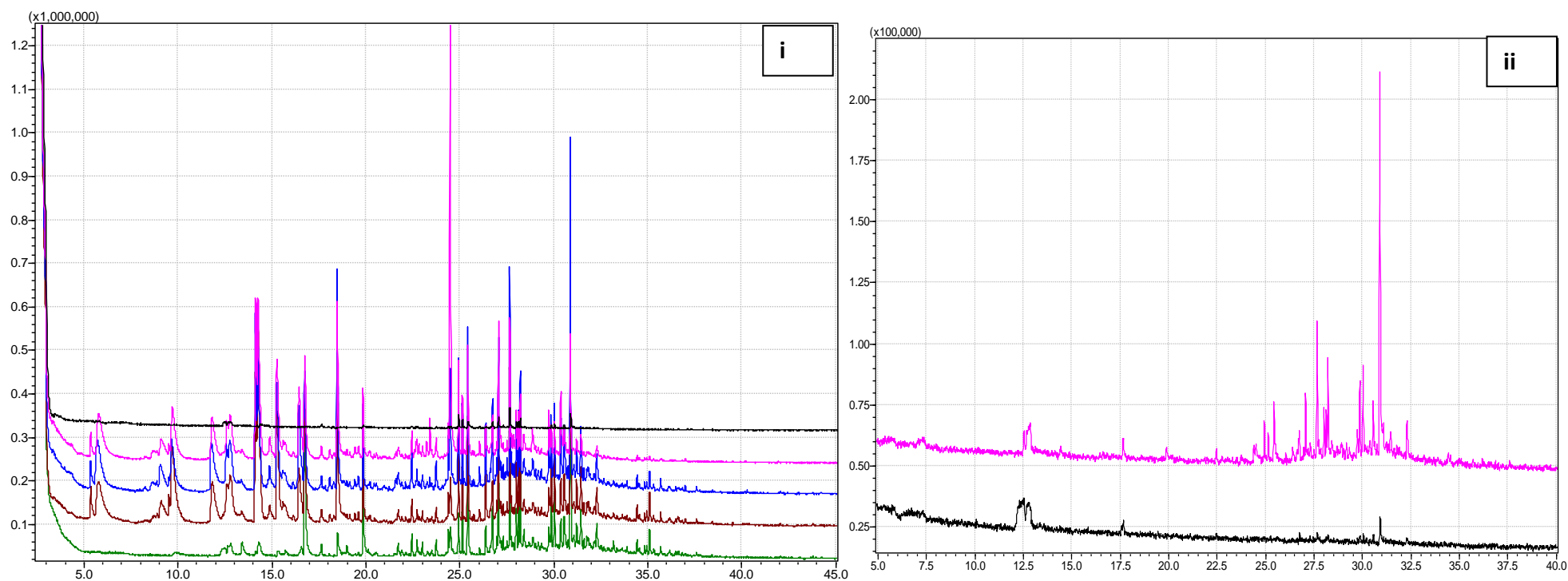


Figura d: Comparação dos perfis cromatográficos obtidos com a fibra de PDMS/DVB: i- branco da fibra condicionada durante 30min a 250°C, **ens 1**, **ens2**, **ens3**, **branco final** ii- Branco da fibra condicionada durante 10min a 250°C, **branco da fibra condicionada durante 30min a 250°C**

GC- Efeito da adição de água

Tabela hh: Média, desvio padrão e o desvio padrão relativo das áreas obtidas para cada quantidade de água adicionada a 1g de farinha

V água (mL)	Área dos compostos	DPr %
0	7649354±1110147	14,51
1	22943672±1533199	6,68
2	32377521±2880624	8,90
3	25293061±4366546	17,26
4	22114493±1973359	8,92
5	11678782±696730	5,97
Global	Média±DP	(DP/Média)x100

Tabela ii: Média desvio padrão e desvio padrão relativo das áreas obtidas para cada quantidade de farinha adicionada aos 2mL de água

Quantidade de farinha (g)	Área dos compostos	DPr %
1	242808522±45514495	18,75
2	254735673±1123431	0,44
3	236497828±36616784	15,48
4	161794374±9678114	5,98
Global	Média±DP	(DP/Média)x100

Efeito da temperatura de extração

Tabela c: Média, desvio padrão e o desvio padrão relativo das áreas obtidas para os compostos presentes em amostras de farinha para cada temperatura de extração estudada (n=3)

Temperatura (°C)	Área dos compostos	DPr (%)
40	44737770±5581710	12,48
50	71315236±5192801	7,28
60	79801124±349897	0,44
70	105385517±19455374	18,46
Global	Média±DP	(DP/Média)x100

Efeito do tempo de extração

Tabela d: Média, desvio padrão e o desvio padrão relativo das áreas obtidas para os compostos presentes em amostras de farinha para cada tempo de extração estudado (n=3)

Tempo (min)	Área dos compostos	DPr %
10	20273146±2173860	10,72
20	33899453±7802138	23,02
30	43097306±3462477	8,03
40	47619235±4005099	8,41
50	43736632±13674446	31,27
60	45962452±4896336	10,65
Global	Média±DP	(DP/Média)x100

Repetibilidade da fibra

Tabela e: Média, desvio padrão e o desvio padrão relativo das áreas obtidas para os compostos ao longo dos ensaios, bem como o para os ensaios sem acondicionamento entre ensaios (corresponde à Figura 23)

Ensaio	Área dos compostos
1	15734953
2	18904366
3	16051484
4	13176819
5	12117368
6	13237195
Média±DP	14870364±2511177
DPr (%)	35,4

Tabela f: Média, desvio padrão e o desvio padrão relativo das áreas obtidas para os aldeídos nos ensaios de temperatura de extração

Composto	50°C			Média	DP	DPr %	60°C			Média	DP	DPr %
<i>Hexanal</i>	2,05E+07	1,59E+07	1,79E+07	18083740	2,33E+06	12,90	2,23E+07	2,26E+07	2,15E+07	2,21E+07	5,99E+05	2,70
<i>Heptanal</i>	7,25E+06	6,42E+06	7,77E+06	7,14E+06	6,81E+05	9,53	6,35E+06	5,67E+06	4,27E+06	5,43E+06	1,06E+06	19,51
<i>2-Heptenal</i>	7,36E+06	7,57E+06	8,42E+06	7,78E+06	5,61E+05	7,21	8,46E+06	8,28E+06	8,76E+06	8,50E+06	2,39E+05	2,81
<i>2-Octenal (E)</i>	7,23E+06	6,08E+06	7,51E+06	6,94E+06	7,54E+05	10,86	9,69E+06	9,40E+06	9,72E+06	9,61E+06	1,75E+05	1,82
<i>Nonanal</i>	5,29E+06	4,35E+06	5,65E+06	5,09E+06	6,71E+05	13,18	4,82E+06	5,67E+06	4,63E+06	5,04E+06	5,51E+05	10,94
<i>2-Nonenal (E)</i>	5,34E+06	5,21E+06	6,58E+06	5,71E+06	7,53E+05	13,20	6,36E+06	7,16E+06	7,78E+06	7,10E+06	7,16E+05	10,08
<i>Decanal</i>	5,99E+05	5,78E+05	8,98E+05	6,91E+05	1,79E+05	25,88	9,98E+05	1,19E+06	8,51E+05	1,01E+06	1,72E+05	16,96
Composto	70°C			Média	DP	DPr %						
<i>Hexanal</i>	3,57E+07	1,08E+07	2,37E+07	2,34E+07	1,24E+07	53,17						
<i>Heptanal</i>	1,28E+07	6,27E+06	6,02E+06	8,36E+06	3,84E+06	45,97						
<i>2-Heptenal</i>	9,09E+06	1,19E+07	9,00E+06	1,00E+07	1,66E+06	16,57						
<i>2-Octenal (E)</i>	1,15E+07	1,34E+07	1,09E+07	1,19E+07	1,31E+06	11,02						
<i>Nonanal</i>	1,19E+07	1,00E+07	6,02E+06	9,30E+06	2,99E+06	32,17						
<i>2-Nonenal (E)</i>	7,30E+06	9,05E+06	7,85E+06	8,07E+06	8,95E+05	11,10						
<i>Decanal</i>	2,23E+06	2,01E+06	1,86E+06	2,03E+06	1,83E+05	8,99						

Tabela g: Média, desvio padrão e o desvio padrão relativo das áreas obtidas para os aldeídos nos ensaios de tempo de extração

Composto	10 min			Média	DP	DPr %	20 min			Média	DP	DPr %
<i>Hexanal</i>	9,93E+05	3,63E+06	3,32E+06	3,48E+06	2,16E+05	6,20E+00	5,35E+06	8,42E+06	5,72E+06	6,50E+06	1,68E+06	2,58E+01
<i>Heptanal</i>	1,47E+06	1,63E+06	7,51E+05	1,55E+06	1,15E+05	7,47E+00	3,52E+06	2,76E+06	2,87E+06	3,05E+06	4,08E+05	1,34E+01
<i>2-Heptenal</i>	3,60E+06	2,47E+06	2,02E+06	2,70E+06	8,18E+05	3,03E+01	3,84E+06	5,06E+06	2,70E+06	3,27E+06	8,05E+05	2,46E+01
<i>2-Octenal €</i>	1,92E+06	2,17E+06	1,82E+06	1,97E+06	1,81E+05	9,20E-02	2,67E+06	4,11E+06	2,06E+06	2,36E+06	4,34E+05	1,84E+01
<i>Nonanal</i>	1,76E+06	1,70E+06		1,73E+06	4,51E+04	2,61E+00	2,31E+06	3,02E+06	1,56E+06	2,66E+06	5,00E+05	1,88E+01
<i>2- Nonenal (E)</i>	1,31E+06	1,22E+06	1,08E+06	1,20E+06	1,15E+05	9,58E+00	2,16E+06	3,02E+06	1,53E+06	2,59E+06	6,14E+05	2,37E+01
<i>Decanal</i>	3,39E+05	3,46E+05	3,52E+05	3,46E+05	6,76E+03	1,96E+00	4,88E+05	6,58E+05	5,19E+05	5,55E+05	9,03E+04	1,63E+01
Composto	30 min			Média	DP	DPr %	40 min			Média	DP	DPr %
<i>Hexanal</i>	1,22E+07	9,71E+06	8,26E+06	1,01E+07	2,01E+06	2,00E+01	1,10E+07	8,82E+06	8,78E+06	9,54E+06	1,28E+06	1,34E+01
<i>Heptanal</i>	3,90E+06	3,15E+06	2,53E+06	3,19E+06	6,86E+05	2,15E+01	2,62E+06	2,62E+06	1,54E+06	2,26E+06	6,27E+05	2,78E+01
<i>2-Heptenal</i>	3,56E+06	5,09E+06	4,79E+06	4,48E+06	8,12E+05	1,81E+01	5,57E+06	4,87E+06	5,59E+06	5,34E+06	4,09E+05	7,65E+00
<i>2-Octenal (E)</i>	2,87E+06	5,00E+06	4,55E+06	4,14E+06	1,12E+06	2,71E+01	5,63E+06	4,88E+06	4,55E+06	5,02E+06	5,50E+05	1,10E+01
<i>Nonanal</i>	3,47E+06	4,35E+06	3,38E+06	3,73E+06	5,35E+05	1,43E+01	3,63E+06	4,31E+06	3,53E+06	3,82E+06	4,22E+05	1,10E+01
<i>2- Nonenal (E)</i>	2,06E+06	3,64E+06	3,61E+06	3,62E+06	2,19E+04	6,05E-01	5,07E+06	4,10E+06	4,69E+06	4,62E+06	4,88E+05	1,06E+01
<i>Decanal</i>	5,01E+05	7,21E+05	6,74E+05	6,32E+05	1,16E+05	1,83E+01	6,88E+05	1,01E+06	7,29E+05	8,08E+05	1,74E+05	2,15E+01

Tabela g (continuação): Média, desvio padrão e o desvio padrão relativo das áreas obtidas para os aldeídos ao longo dos ensaios de tempo de extração

Composto	50 min			Média	DP	DPr %	60 min			Média	DP	DPr %
<i>Hexanal</i>	1,15E+07	7,06E+06	9,24E+06	9,28E+06	2,24E+06	2,42E+01	1,36E+07	9,21E+06	1,29E+07	1,19E+07	2,36E+06	1,98E+01
<i>Heptanal</i>	3,24E+06	5,38E+05	2,17E+06	2,70E+06	7,57E+05	2,80E+01	1,76E+06	2,57E+06	2,62E+06	2,32E+06	4,83E+05	2,09E+01
<i>2-Heptenal</i>	6,52E+06	3,75E+06	4,63E+06	4,97E+06	1,41E+06	2,85E+01	4,28E+06	4,78E+06	5,23E+06	4,77E+06	4,76E+05	1,00E+01
<i>2-Octenal (E)</i>	6,84E+06	3,37E+06	4,74E+06	5,79E+06	1,49E+06	2,57E+01	4,66E+06	5,05E+06	6,34E+06	5,35E+06	8,78E+05	1,64E+01
<i>Nonanal</i>	5,10E+06	2,59E+06	3,01E+06	2,80E+06	2,98E+05	1,06E+01	3,65E+06	2,90E+06	3,29E+06	3,28E+06	3,73E+05	1,14E+01
<i>2-Nonenal (E)</i>	6,38E+06	3,57E+06	4,60E+06	4,85E+06	1,42E+06	2,93E+01	4,09E+06	4,35E+06	5,41E+06	4,62E+06	7,00E+05	1,52E+01
<i>Decanal</i>	8,42E+05	4,93E+05	5,20E+05	5,06E+05	1,91E+04	3,77E+00	7,39E+05	6,87E+05	5,74E+05	6,67E+05	8,43E+04	1,26E+01

Espectros de massa para os compostos identificados

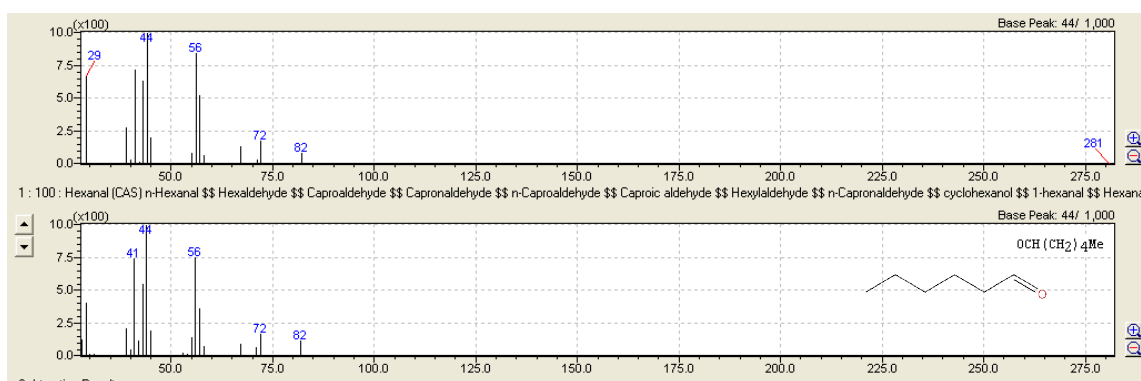


Figura e: Comparação do espectro obtido com o espectro de referência para o hexanal, na biblioteca de espectros

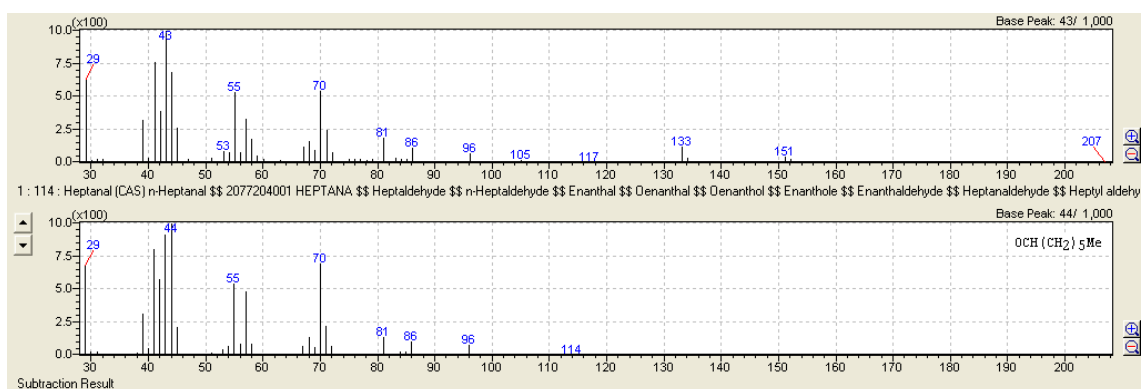


Figura f: Comparação do espectro obtido com o espectro de referência para o heptanal, na biblioteca de espectros

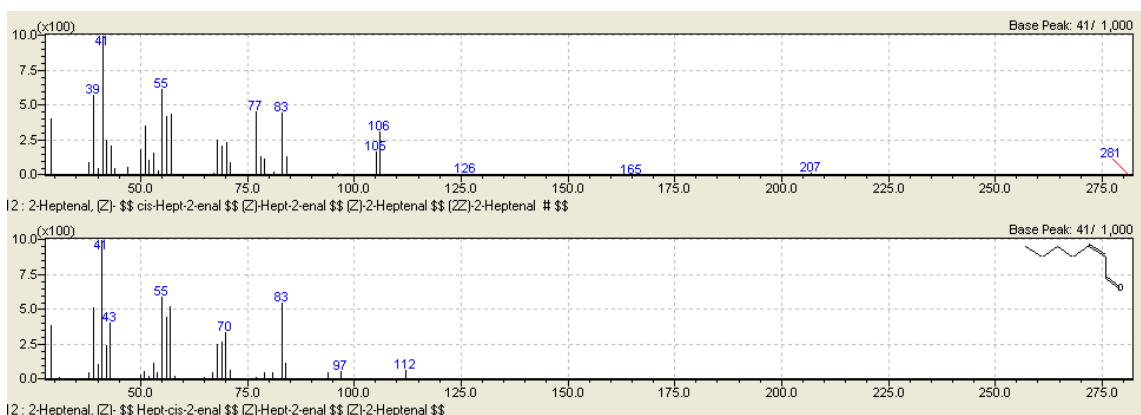


Figura g: Comparação do espectro obtido com o espectro de referência para o 2-heptenal (Z), na biblioteca de espectros

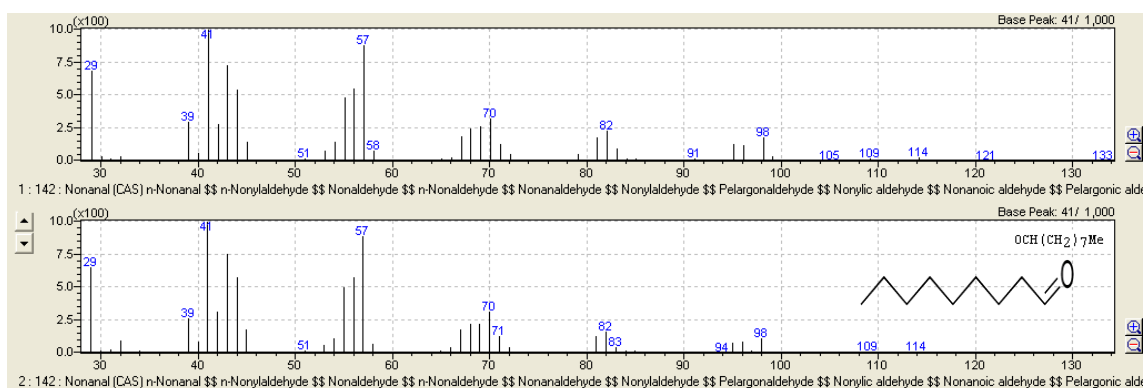


Figura h: Comparação do espectro obtido com o espectro de referência para o nonanal, na biblioteca de espectros

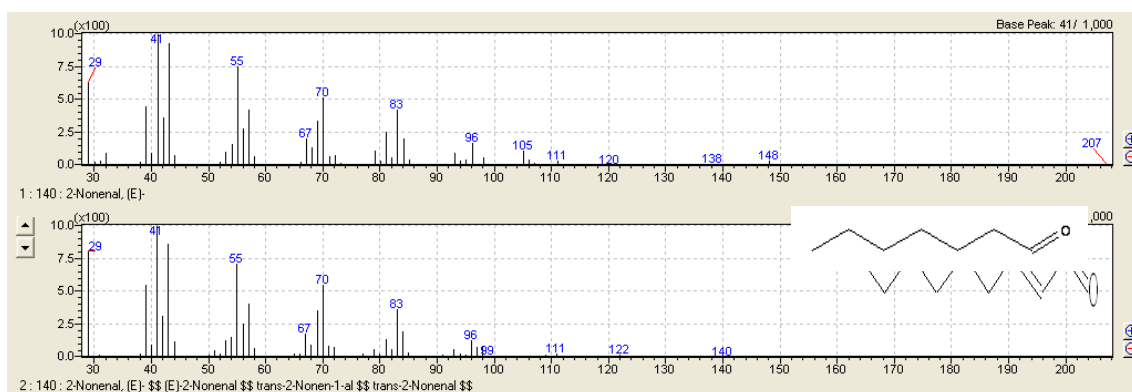


Figura i: Comparação do espectro obtido com o espectro de referência para o 2-nonenal (E), na biblioteca de espectros

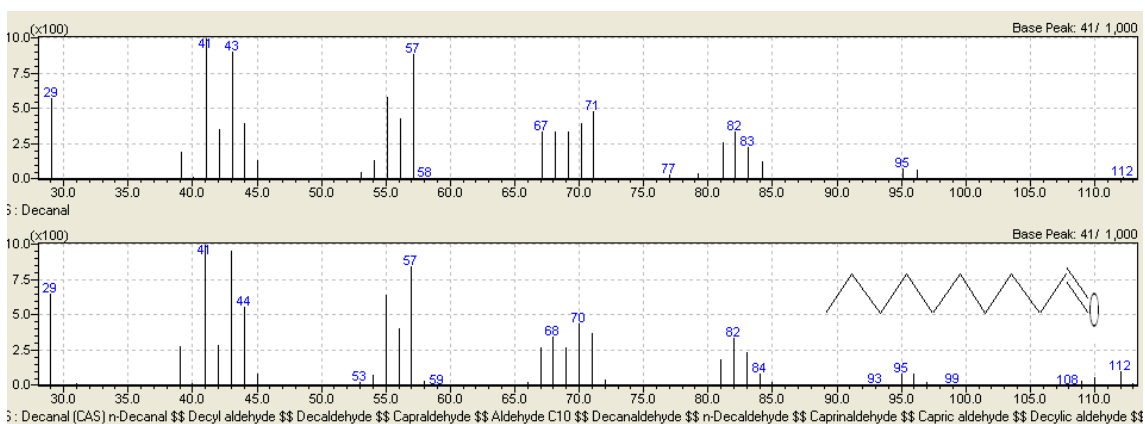


Figura j: Comparação do espectro obtido com o espectro de referência para o decanal na biblioteca de espectros do software GCMSsolution

Anexo III- Compostos Fenólicos

Tabela a: Média, desvio padrão e desvio padrão relativo para as absorvâncias obtidas para os diversos extratantes; quantificação de compostos fenólicos totais no extratos de farinha de milho por espectrofotometria UV-Vis a 725nm (Método de Folin-Ciocalteu) (n=3)

	Extratante	Abs a 725nm	Média± DP	DPr (%)	[Ácido gálico] (ppm)	[mg eq AG/100g amostra]
1	EtOH/H ₂ O 20% 1	0,1346	0,1327±0,002707	2,04	1,55	77,5
	EtOH/ H ₂ O 20% 2	0,1296				
	EtOH/ H ₂ O 20% 3	0,1339				
2	EtOH/ H ₂ O 50% 1	0,229	0,222667±0,006561	2,95	2,5	125
	EtOH/ H ₂ O 50% 2	0,2159				
	EtOH/ H ₂ O 50% 3	0,2231				
3	EtOH/ H ₂ O 80% 1	0,0819	0,0789±0,003	3,80	0,98	49
	EtOH/ H ₂ O 80% 2	0,0789				
	EtOH/ H ₂ O 80% 3	0,0759				
4	EtOH 1	0,0517	0,048233±0,004461	9,25	0,66	33
	EtOH 2	0,0498				
	EtOH 3	0,0432				
5	Acetona 1	0,0242	0,028333±0,003717	13,12	0,45	22,5
	Acetona 2	0,0314				
	Acetona 3	0,0294				

Tabela b: Média, desvio padrão e desvio padrão relativo para as absorvâncias obtidas para os diversos extratos; quantificação de compostos fenólicos totais nos extratos de farinha de milho por espectrofotometria UV-Vis a 725nm (Método de Folin-Ciocalteu) (n=3)

Amostra (Réplica)	Abs a 725nm (mAU)	[] (mg eq AG/L)	[] Média± DP	DPr %	[] Média (mg eq AG/100g)
1(1)	0,2759	176,20	173,2± 4,62	2,67	173,29
1(2)	0,2625	167,96			
1(3)	0,2751	175,71			
2(1)	0,2083	125,20	127,41± 2,19	1,72	127,41
2(2)	0,2123	127,47			
2(3)	0,216	129,57			
3(1)	0,2521	189,58	188,19± 9,55	5,08	188,19
3(2)	0,2349	178,02			
3(3)	0,2631	196,98			
4(1)	0,2137	163,78	171,82± 7,17	4,17	171,82
4(2)	0,2291	174,13			
4(3)	0,2342	177,55			
5(1)	0,1879	122,08	124,50± 2,37	1,90	124,50
5(2)	0,1956	126,81			
5(3)	0,192	124,60			
6(1)	0,2357	135,66	137,28± 7,04	5,13	137,28
6(2)	0,2282	131,18			
6(3)	0,2513	144,98			
7(1)	0,1779	115,93	122,63± 7,87	6,42	122,63
7(2)	0,1856	120,66			
7(3)	0,2029	131,30			
8(1)	0,235	140,35	146,69± 6,50	4,43	146,69
8(2)	0,2456	146,37			
8(3)	0,2579	153,35			
9(1)	0,2388	137,51	139,84± 5,99	4,29	139,84
9(2)	0,2352	135,36			
9(3)	0,2541	146,65			
10(1)	0,2154	138,99	137,58± 1,24	0,90	137,58
10(2)	0,2116	136,65			
10(3)	0,2123	137,08			
11(1)	0,2346	135,01	130,13± 6,05	4,65	130,13
11(2)	0,2151	123,36			
11(3)	0,2296	132,02			
12(1)	0,2325	149,51	149,71± 4,49	3,00	149,71
12(2)	0,2257	145,33			
12(3)	0,2403	154,31			

Tabela b (continuação): Média, desvio padrão e desvio padrão relativo para as absorvâncias obtidas para os diversos extratos; quantificação de compostos fenólicos totais nos extratos de farinha de milho por espectrofotometria UV-Vis a 725nm (Método de Folin-Ciocalteu)

Amostra (Réplica)	Abs a 725nm (mAU)	[] (mg eq AG/L)	[] Média± DP	DPr %	[] Média (mg eq AG/100g)
13(1)	0,2431	183,53	187,30± 7,59	4,05	187,30
13(2)	0,2413	182,33			
13(3)	0,2617	196,03			
14(1)	0,2004	120,72	122,15± 1,76	1,44	122,15
14(2)	0,2064	124,12			
14(3)	0,202	121,62			
15(1)	0,2007	129,95	136,67± 5,86	4,29	136,67
15(2)	0,2182	140,71			
15(3)	0,216	139,36			
16(1)	0,2294	174,33	179,12± 9,19	5,13	179,12
16(2)	0,2523	189,72			
16(3)	0,2279	173,32			
17(1)	0,2055	117,62	120,31± 2,92	2,43	120,31
17(2)	0,2152	123,42			
17(3)	0,2093	119,89			
18(1)	0,2391	180,85	176,08± 4,15	2,36	176,08
18(2)	0,229	174,06			
18(3)	0,2279	173,32			
19(1)	0,2155	129,28	134,35± 6,74	5,01	134,35
19(2)	0,2379	142,00			
19(3)	0,2199	131,78			
20(1)	0,2632	152,09	159,50± 6,51	4,08	159,50
20(2)	0,2799	162,07			
20(3)	0,2837	164,34			
21(1)	0,194	117,08	120,73± 5,37	4,45	120,73
21(2)	0,196	118,22			
21(3)	0,2113	126,90			
22(1)	0,1997	129,34	132,68± 3,03	2,28	132,68
22(2)	0,2093	135,24			
22(3)	0,2064	133,46			
23(1)	0,206	123,89	129,57± 4,94	3,81	129,57
23(2)	0,2201	131,90			
23(3)	0,2219	132,92			
24(1)	0,2381	152,95	152,79± 1,06	0,69	152,79
24(2)	0,236	151,66			
24(3)	0,2394	153,75			

Tabela b (continuação): Média, desvio padrão e desvio padrão relativo para as absorvâncias obtidas para os diversos extratos; quantificação de compostos fenólicos totais nos extratos de farinha de milho por espectrofotometria UV-Vis a 725nm (Método de Folin-Ciocalteu)

Amostra (Réplica)	Abs a 725nm (mAU)	[] (mg eq AG/L)	[] Média± DP	DPr %	[] Média (mg eq AG/100g)
25(1)	0,2332	126,18	122,33± 3,61	2,95	122,33
25(2)	0,2246	121,76			
25(3)	0,2193	119,03			
26(1)	0,2497	134,67	130,66± 4,26	3,26	130,66
26(2)	0,2332	126,18			
26(3)	0,2428	131,12			
27(1)	0,2253	141,56	142,68± 2,30	1,62	142,68
27(2)	0,2307	145,33			
27(3)	0,2247	141,14			
28(1)	0,23	139,12	138,95± 3,74	2,69	138,95
28(2)	0,236	142,59			
28(3)	0,2231	135,13			
29(1)	0,2024	123,15	124,04± 0,90	0,72	124,04
29(2)	0,2055	124,94			
29(3)	0,2039	124,02			
30(1)	0,2127	132,78	132,85± 10,29	7,74	132,85
30(2)	0,2276	143,17			
30(3)	0,1981	122,59			
31(1)	0,1723	98,38	97,83± 0,49	0,50	97,83
31(2)	0,171	97,63			
31(3)	0,1707	97,46			
32(1)	0,2359	142,53	141,98± 6,12	4,31	141,98
32(2)	0,2450	147,80			
32(3)	0,2239	135,59			
33(1)	0,2654	159,61	162,75± 3,28	2,01	162,75
33(2)	0,2704	162,50			
33(3)	0,2767	166,15			
34(1)	0,2546	137,19	131,77± 4,74	3,60	131,77
34(2)	0,2401	129,73			
34(3)	0,2375	128,40			
35(1)	0,2233	121,44	123,63± 3,36	2,72	123,63
35(2)	0,2352	127,49			
35(3)	0,2243	121,95			
36(1)	0,253	136,37	136,61± 4,89	3,58	136,61
36(2)	0,2442	131,84			
36(3)	0,2632	141,62			

Tabela b (continuação): Média, desvio padrão e desvio padrão relativo para as absorvâncias obtidas para os diversos extratos; quantificação de compostos fenólicos totais nos extratos de farinha de milho por espectrofotometria UV-Vis a 725nm (Método de Folin-Ciocalteu)

Amostra (Réplica)	Abs a 725nm (mAU)	[] (mg eq AG/L)	Média± DP	DPr %	[] Média (mg eq AG/100g)
37(1)	0,2345	137,70	148,13± 9,34	6,31	148,13
37(2)	0,2666	155,73			
37(3)	0,2581	150,96			
38(1)	0,2364	128,11	129,75± 1,86	1,43	129,75
38(2)	0,2389	129,38			
38(3)	0,2436	131,77			
39(1)	0,2665	160,24	153,74± 6,54	4,25	153,74
39(2)	0,2439	147,16			
39(3)	0,2554	153,82			
40(1)	0,2259	129,33	137,41± 7,23	5,26	137,41
40(2)	0,2438	139,67			
40(3)	0,25	143,24			
41(1)	0,2146	126,52	122,30± 4,19	3,42	122,30
41(2)	0,2070	122,25			
41(3)	0,1997	118,15			
42(1)	0,2029	116,05	121,63± 5,15	4,24	121,63
42(2)	0,2143	122,63			
42(3)	0,2205	126,21			
43(1)	0,153	87,24	91,26± 4,81	5,27	91,26
43(2)	0,1577	89,95			
43(3)	0,1692	96,59			
44(1)	0,1969	112,59	110,82± 3,47	3,14	110,82
44(2)	0,1977	113,05			
44(3)	0,1869	106,81			
45(1)	0,2629	167,78	171,57± 4,76	2,78	171,57
45(2)	0,2661	170,01			
45(3)	0,276	176,92			
46(1)	0,1705	124,21	146,19± 19,07	13,04	146,19
46(2)	0,2262	158,25			
46(3)	0,2227	156,11			
47(1)	0,2139	129,80	129,98± 1,60	1,23	129,98
47(2)	0,2171	131,66			
47(3)	0,2116	128,47			
48(1)	0,1968	107,94	107,37± 0,50	0,47	107,37
48(2)	0,1952	107,13			
48(3)	0,195	107,03			

Tabela b (continuação): Média, desvio padrão e desvio padrão relativo para as absorvâncias obtidas para os diversos extratos; quantificação de compostos fenólicos totais nos extratos de farinha de milho por espectrofotometria UV-Vis a 725nm (Método de Folin-Ciocalteu)

Amostra (Réplica)	Abs a 725nm (mAU)	[] (mg eq AG/L)	Média±DP	DPr %	[] Média (mg eq AG/100g)
49(1)	0,1874	103,16	99,75± 4,12	4,13	99,75
49(2)	0,1717	95,16			
49(3)	0,183	100,92			
50(1)	0,2296	144,56	132,52±10,91	8,23	132,52
50(2)	0,2083	129,71			
50(3)	0,1991	123,29			
51(1)	0,205	124,65	126,23±7,65	6,06	126,23
51(2)	0,2221	134,55			
51(3)	0,1961	119,50			

Tabela c: Reta de calibração do ácido gálico realizada para as experiências dos fenóis totais, pelo método de Folin-Ciocalteu

Concentração (ppm)	Abs 725nm
1	0,0816
2	0,1779
3	0,2480
4	0,3428
5	0,4266
6	0,5119
B	0,0000

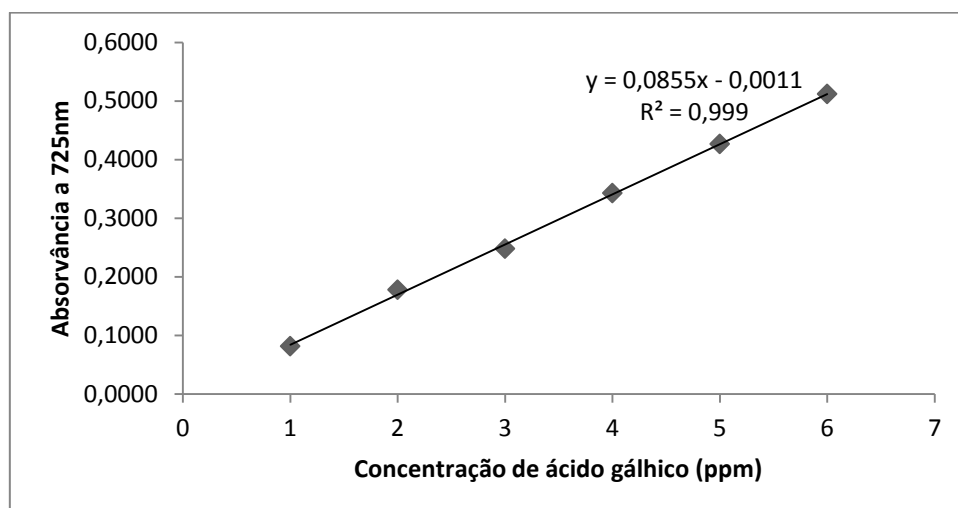


Figura a: Reta de calibração do ácido gálico obtida por espectrofotometria a 725nm

Tabela d: Reta de calibração do ácido gálico realizada para as experiências dos fenóis totais obtida por HPLC-DAD a 280nm

Concentração (ppm)	Área do pico a 280nm
5	1506821
10	3338716
20	6671400
40	12559166
60	18264133
80	24521513
100	30196449
200	58854725

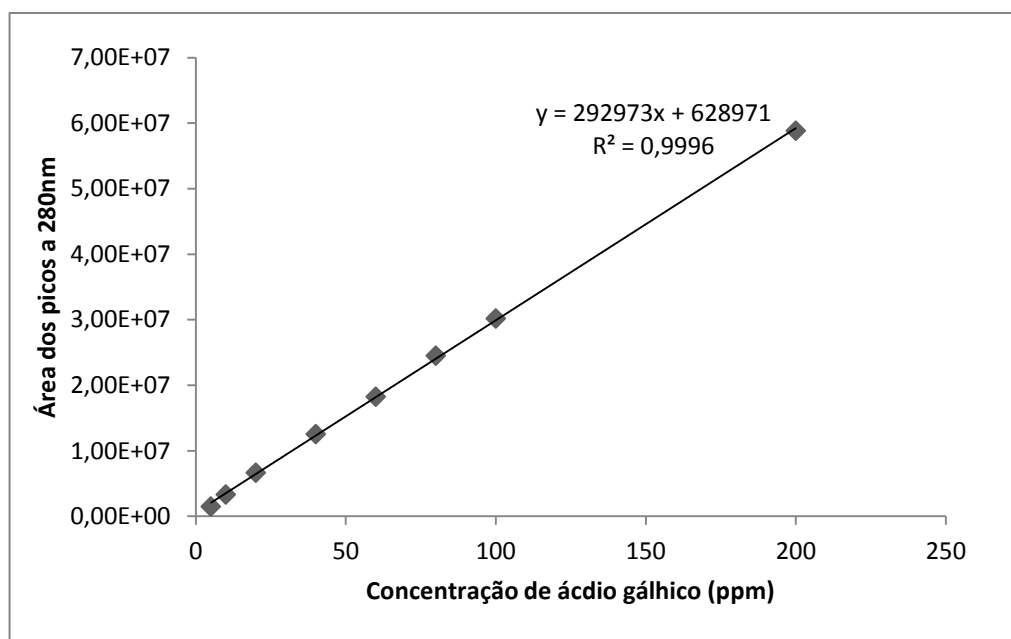
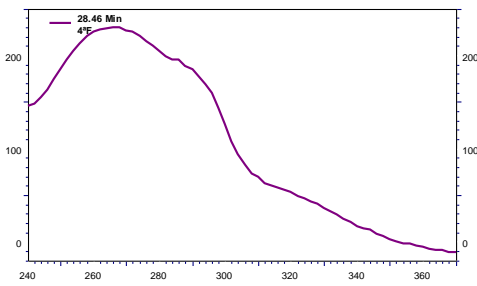
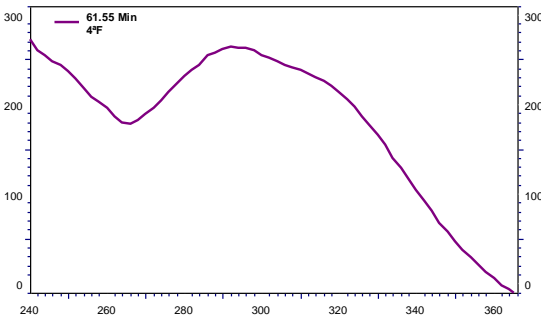
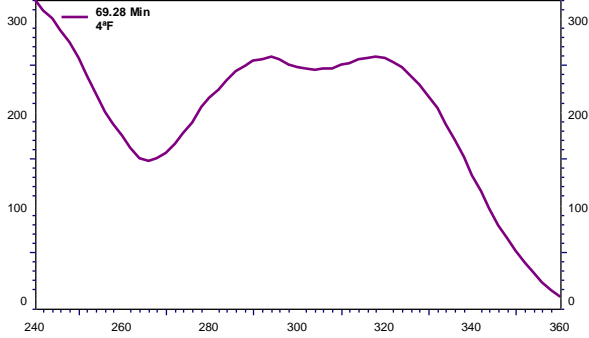


Figura b : Recta de calibração do ácido gálico obtida por HPLC-DAD a 280nm

Tabela e: Espectros UV-Vis e tempo de retenção dos picos desviantes das experiências dos fenóis totais, adquiridos no *software* Chromquest

Nº pico	Tempo de retenção (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Espectro UV-Vis
6	28.46	270	
15	61.66	290	
17	69.28	290,320	

Estudo de diferentes variedades de milho utilizadas na produção de Broa

Tabela f : Média, desvio padrão e o desvio padrão relativo das áreas totais a 280 e 360 nm obtidas para os vários extratos, por HPLC-DAD

Amostra (Réplica)	Área 280nm (mAU)	Média ± DP	DPr (%)	Área 360nm (mAU)	Média ± DP	DPr (%)
1 (1)	97591989	106041459± 11949355	11,27	8002930	8206483± 287867	3,51
1 (2)	114490929			8410035		
1 (3)						
2 (1)	130003158	116143052± 14692797	12,65	7712002	7203607± 632187	8,78
2 (2)	100739430			6495746		
2 (3)	117686567			7403074		
3 (1)	102811384	107531199± 5865715	5,45	8781612	9130432± 350124	3,83
3 (2)	114098139			9481846		
3 (3)	105684075			9127837		
4 (1)	114569853	137997980± 20791396	15,07	8052773	9858605± 1682926	17,07
4 (2)	145170642			10139855		
4 (3)	154253444			11383187		
5(1)	151941028	127703063± 21004525	16,45	10250160	7991222± 1961838	24,55
5(2)	116346241			6714423		
5(3)	114821921			7009082		
6(1)	152329832	152144277± 7507994	4,93	11289330	11349836± 871444	7,68
6(2)	159557774			12249956		
6(3)	144545225			10510221		
7(1)	90619586	97998118± 10239749	10,45	4449141	4530135± 469230	10,36
7(2)	109688659			5034590		
7(3)	93686109			4106674		
8(1)	126423525	134137594± 7258283	5,41	9440864	9684828± 374685	3,87
8(2)	140832327			10116245		
8(3)	135156931			9497374		
9(1)	139563170	164989884± 22468948	13,62	10014899	11303489± 1221197	10,80
9(2)	182171494			12443741		
9(3)	173234989			11451827		
10(1)	188306295	180515222± 11018241	6,10	13191637	12201684± 1400006	11,47
10(2)	172724149			11211730		
10(3)						
11(1)	145366796	153096614± 16698786	10,91	8329928	8643889± 956815	11,07
11(2)	141663259			7883501		

Estudo de diferentes variedades de milho utilizadas na produção de Broa

Tabela f (continuação): Média, desvio padrão e o desvio padrão relativo das áreas totais a 280 e 360 nm obtidas para os vários extratos, por HPLC-DAD

Amostra (Réplica)	Área 280nm (mAU)	Média ± DP	DPr (%)	Área 360nm (mAU)	Média ± DP	DPr (%)
11(3)	172259787			9718239		
12(1)	140012779	141107269± 1547843	1,10	8371600	8311893± 84439	1,02
12(2)	142201759			8252185		
12(3)						
13(1)	162325466	153645056± 21263174	13,84	10578199	10380989± 1193767	11,50
13(2)	129414893			9100897		
13(3)	169194808			11463870		
14(1)	127856003	100120633± 26384180	26,35	6128835	5003535± 1036919	20,72
14(2)	97170222			4795110		
14(3)	75335673			4086660		
15(1)	116016800	131177331± 18465205	14,08	9164742	9329133± 143474	1,54
15(2)	125773664			9393535		
15(3)	151741529			9429122		
16(1)	151136049	141968012± 16522124	11,64	10108119	9626303± 922003	9,58
16(2)	122894656			8563216		
16(3)	151873330			10207575		
17(1)	180262235	174838801± 11901440	6,81	9218360	9450948± 434705	4,60
17(2)	183062533			9952463		
17(3)	161191634			9182020		
18(1)	182038197	148036337± 29553389	19,96	8910780	7452306± 1264907	16,97
18(2)	128523841			6655031		
18(3)	133546973			6791106		
19(1)	118413955	130975644± 13591126	10,38	6883750	8027063± 1036427	12,91
19(2)	145403370			8905000		
19(3)	129109606			8292438		
20(1)	156863740	164910660± 7017756	4,26	9277993	9263947± 29444	0,32
20(2)	168106953			9230110		
20(3)	169761288			9283739		
21(1)	111160937	102136747± 9709255	9,51	6293540	5955472± 550113	9,24
21(2)	103385955			6252171		
21(3)	91863348			5320705		

Tabela f (continuação): Média, desvio padrão e o desvio padrão relativo das áreas totais a 280 e 360 nm obtidas para os vários extratos, por HPLC-DAD

Amostra (Réplica)	Área 280nm (mAU)	Média ± DP	DPr (%)	Área 360nm (mAU)	Média ± DP	DPr (%)
22(1)	103347297	105332899± 2808065	2,67	6834407	7069910± 333051	4,71
22(2)	107318500			7305412		
22(3)						
23(1)	134724668	124531559± 12732001	10,22	7880432	7394370± 553533	7,49
23(2)	128609930			7510791		
23(3)	110260080			6791886		
24(1)	204168289	206066038± 2683822	1,30	12247375	11938071± 437422	3,66
24(2)	207963786			11628767		
24(3)						
25(1)	67728236	87842807± 24768319	28,20	13810803	42135100± 25747169	61,11
25(2)	115507553			64121402		
25(3)	80292631			48473095		
26(1)	108334832	98824023± 9035342	9,14	55330982	41920164± 17852719	42,59
26(2)	90354351			21656287		
26(3)	97782885			48773223		
27(1)	119194824	124236732± 6528636	5,25	47606117	44864278± 13866650	30,91
27(2)	131611289			29831524		
27(3)	121904082			57155193		
28(1)	52919131	40436247± 14943000	36,95	17119714	11408501± 5264908	46,15
28(2)	23878485			6748515		
28(3)	44511124			10357273		
29(1)	92245605	92245605		20518671	20518671	
30(1)	112404627	112693932± 6361175	5,64	43034355	41913074± 6328626	15,10
30(2)	119194824			47606117		
30(3)	106482345			35098751		
31(1)	71334877	80417157± 11595565	14,42	2118981	2862734± 684434	23,91
31(2)	76438246			3466071		
31(3)	93478348			3003151		

Estudo de diferentes variedades de milho utilizadas na produção de Broa

Tabela f (continuação): Média, desvio padrão e o desvio padrão relativo das áreas totais a 280 e 360 nm obtidas para os vários extratos, por HPLC-DAD

Amostra (Réplica)	Área 280nm (mAU)	Média ± DP	DPr (%)	Área 360nm (mAU)	Média ± DP	DPr (%)
32(1)	120838794	120838794		8040265	8040265	
33(1)	143118417	153609067± 9194413	5,99	9538074	9816223± 293472	2,99
33(2)	160267517			9787665		
33(3)	157441268			10122930		
34(1)	93637050	95647355± 2355001	2,46	43459987	34523517± 14153426	41,00
34(2)	95066621			41905350		
34(3)	98238394			18205215		
35(1)	77536736	74842388± 7088825	9,47	23382489	37139154± 14740228	39,69
35(2)	80189003			52697345		
35(3)	66801425			35337627		
36(1)	117379434	118376464± 2130984	1,80	56371727	34766946± 18714371	53,83
36(2)	116926764			23573677		
36(3)	120823194			24355435		
37(1)	94355229	102079126± 6699029	6,56	23906749	24353458± 9287382	38,14
37(2)	106305825			33856133		
37(3)	105576325			15297491		
38(1)	87216660	70209767± 15406721	21,94	29718474	17516272± 10604305	60,54
38(2)	66227520			10531440		
38(3)	57185120			12298901		
39(1)	111390343	117438481± 6683739	5,69	48474490	43731342± 12840082	29,36
39(2)	116310758			29194465		
39(3)	124614343			53525072		
40(1)	61985156	106109055± 41636236	39,24	22363996	38368188±	71,86
40(2)	111636578			22536865		
40(3)	144705431			70203703		
41(1)	124694695	137327070± 10981357	8,00	19587335	37522547± 17406037	46,39
41(2)	142690617			38634183		
41(3)	144595898			54346123		
42(1)	53806709	80117307± 23050193	28,77	12065798	18495724± 5584088	30,19
42(2)	96754808			21293458		
42(3)	89790403			22127915		

Tabela f (continuação): Média, desvio padrão e o desvio padrão relativo das áreas totais a 280 e 360 nm obtidas para os vários extratos, por HPLC-DAD

Amostra (Réplica)	Área 280nm (mAU)	Média ± DP	DPr (%)	Área 360nm (mAU)	Média ± DP	DPr (%)
43(1)	79594077	78045566± 4000832	5,13	15216030	15761485± 509560	3,23
43(2)	73501928			16225290		
43(3)	81040693			15843135		
44(1)	84476058	90535352± 8132645	8,98	21434324	24522865± 2792286	11,39
44(2)	99778181			25265545		
44(3)	87351816			26868727		
45(1)	147035704	147319036± 30173758	20,48	57762916	49763168± 11862862	23,84
45(2)	177633463			55392963		
45(3)	117287942			36133625		
46(1)	111832604	102115205± 9100592	8,91	27434371	25460963± 1759218	6,91
46(2)	93792420			24057016		
46(3)	100720591			24891501		
47(1)	112554463	111733889± 10115969	9,05	7067285	7196248± 1191113	16,55
47(2)	121414579			8446595		
47(3)	101232625			6074864		
48(1)	76938387	84792621± 7378715	8,70	43960482	38489583± 11238308	29,20
48(2)	85859898			25563378		
48(3)	91579579			45944890		
49(1)	48376961	52875761± 4497886	8,51	27624075	26106444± 11898496	48,15
49(2)	52877590			37848679		
49(3)	57372733			12846577		
50(1)	112459426	107927094± 6906854	6,40	48359915	42851147± 11898496	27,77
50(2)	99977786			29196566		
50(3)	111344070			50996961		
51(1)	117566981	135335875± 15536310	11,48	7085080	8147222± 954176	11,71
51(2)	142080987			8931952		
51(3)	146359656			8424633		

Tabela g: Reta de calibração do ácido gálico obtida por HPLC-DAD a 280nm

Concentração (ppm)	Área do pico
5	1506821
10	3338716
20	6671400
40	12559166
60	18264133
80	24521513

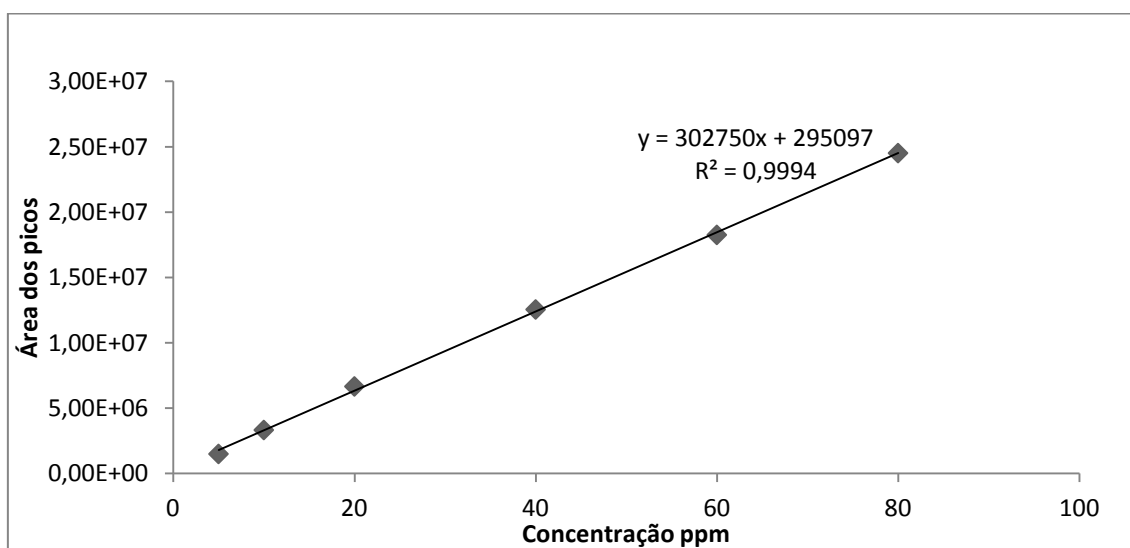


Figura c: Reta de calibração do ácido gálico obtida por HPLC-DAD a 280nm

Tabela h: Quantificação dos flavonóides totais por espectrofotometria UV-Vis a 510nm

Amostra (Réplica)	Abs 510nm (mAU)	[mg eq CAT/L]	Média± DP (mg eq CAT/L)	DPr (%)
1(1)	0,1167	6,99	7,02± 0,13	1,89
1(2)	0,1196	7,16		
1(3)	0,1150	6,90		
2(1)	0,0874	5,30	5,78± 0,46	8,03
2(2)	0,1036	6,22		
2(3)	0,0966	5,82		
3(1)	0,1519	9,53	9,35± 0,16	1,70
3(2)	0,1480	9,30		
3(3)	0,1465	9,22		
4(1)	0,2012	12,34	11,66± 0,82	7,06
4(2)	0,1733	10,75		
4(3)	0,1935	11,90		
5(1)	0,1386	8,25	8,50± 0,33	3,88
5(2)	0,1496	8,87		
5(3)	0,1411	8,39		
6(1)	0,1680	9,90	10,56± 0,58	5,53
6(2)	0,1828	10,75		
6(3)	0,1876	11,02		
7(1)	0,1104	6,63	6,56± 0,25	3,85
7(2)	0,1041	6,27		
7(3)	0,1126	6,76		
8(1)	0,2056	12,05	11,80± 0,22	1,83
8(2)	0,1996	11,71		
8(3)	0,1986	11,65		
9(1)	0,0978	5,89	6,15± 0,39	6,38
9(2)	0,1103	6,61		
9(3)	0,0991	5,97		
10(1) s/ diluição	0,0376	2,47	2,53± 0,07	2,91
10(2) s/ diluição	0,0400	2,61		
10(3) s/ diluição	0,0380	2,50		
11(1)	0,0909	5,50	5,86± 0,45	7,75
11(2)	0,0948	5,72		
11(3)	0,1062	6,37		
12(1)	0,1229	7,35	7,55 0,18	2,36
12(2)	0,1274	7,61		
12(3)	0,1289	7,69		

Tabela h (continuação): Quantificação dos flavonóides totais por espectrofotometria UV-Vis a 510nm

Amostra (Réplica)	Abs 510nm (mAU)	[mg eq CAT/L]	Média± DP (mg eq CAT/L)	DPr (%)
13(1)	0,1274	8,13	8,12± 0,07	0,92
13(2)	0,1285	8,19		
13(3)	0,1259	8,04		
14(1)	0,2871	17,25	16,64± 0,69	4,17
14(2)	0,2788	16,78		
14(3)	0,2632	15,89		
15(1)	0,1146	6,87	7,26± 0,34	4,69
15(2)	0,1233	7,37		
15(3)	0,1260	7,53		
16(1)	0,2461	14,91	14,21± 0,65	4,58
16(2)	0,2318	14,09		
16(3)	0,2236	13,62		
17(1)	0,1083	6,49	6,76± 0,24	3,52
17(2)	0,1143	6,83		
17(3)	0,1163	6,95		
18(1)	0,1067	6,42	6,62± 0,20	3,03
18(2)	0,1137	6,82		
18(3)	0,1099	6,61		
19(1)	0,1799	10,61	10,43± 0,33	3,12
19(2)	0,1702	10,05		
19(3)	0,1802	10,62		
20(1)	0,1068	6,41	6,77± 0,31	4,64
20(2)	0,1166	6,97		
20(3)	0,1160	6,93		
21(1)	0,1196	7,68	8,03± 0,37	4,57
21(2)	0,1250	7,99		
21(3)	0,1324	8,41		
22(1) diluição 1:2	0,0566	1,78	1,64± 0,12	7,47
22(2) diluição 1:2	0,0482	1,54		
22(3) diluição 1:2	0,0508	1,61		
23(1)	0,1477	9,29	8,95± 0,38	4,24
23(2)	0,1431	9,02		
23(3)	0,1346	8,54		
25(1)	0,2027	11,89	12,49± 0,55	4,44
25(2)	0,2218	12,98		
25(3)	0,2152	12,60		

Tabela h (continuação): Quantificação dos flavonóides totais por espectrofotometria UV-Vis a 510nm

Amostra (Réplica)	Abs 510nm (mAU)	[mg eq CAT/L]	Média± DP (mg eq CAT/L)	DPr (%)
26(1)	0,1145	6,85	6,55± 0,26	3,94
26(2)	0,1060	6,36		
26(3)	0,1076	6,45		
27(1)	0,0827	5,03	4,81± 0,24	4,97
27(2)	0,0795	4,85		
27(3)	0,0744	4,55		
28(1)	0,0424	2,75	2,91± 0,15	5,15
28(2)	0,0456	2,93		
28(3)	0,0476	3,05		
29(1)	0,0907	5,51	5,42± 0,09	1,69
29(2)	0,0890	5,41		
29(3)	0,0875	5,33		
30(1)	0,0730	4,47	4,55± 0,08	1,76
30(2)	0,0744	4,55		
30(3)	0,0758	4,63		
31(1)	0,2465	14,93	15,48± 0,52	3,35
31(2)	0,2574	15,55		
31(3)	0,2645	15,96		
32(1) s/ diluição	0,0388	2,54	2,49± 0,05	1,91
32(2) s/ diluição	0,0372	2,45		
32(3) s/ diluição	0,0376	2,47		
33(1)	0,2165	13,22	12,69± 0,48	3,80
33(2)	0,2052	12,57		
33(3)	0,2000	12,27		
34(1)	0,1087	7,06	7,07±	0,12
34(2)	0,1068	6,95		
34(3)	0,1111	7,19		
35(1)	0,0809	4,93	5,05± 0,11	2,25
35(2)	0,0835	5,07		
35(3)	0,0848	5,15		
36(1)	0,1550	9,16	9,08± 0,44	4,84
36(2)	0,1454	8,61		
36(3)	0,1606	9,48		
37(1)	0,0986	5,94	5,71± 0,19	3,38
37(2)	0,0927	5,60		
37(3)	0,0928	5,61		

Tabela h (continuação): Quantificação dos flavonóides totais por espectrofotometria UV-Vis a 510nm

Amostra (Réplica)	Abs 510nm (mAU)	[mg eq CAT/L]	Média± DP (mg eq CAT/L)	DPr (%)
38(1)	0,2461	14,91	14,21± 0,65	4,58
38(2)	0,2318	14,09		
38(3)	0,2236	13,62		
39(1)	0,0983	5,92	6,03± 0,18	2,98
39(2)	0,0984	5,93		
39(3)	0,1038	6,23		
40(1)	0,0759	4,64	4,82± 0,17	3,48
40(2)	0,0817	4,97		
40(3)	0,0796	4,85		
41(1)	0,0914	5,53	5,96± 0,42	7,02
41(2)	0,0995	5,99		
41(3)	0,1060	6,36		
42(1)	0,1354	8,04	8,14± 0,09	1,13
42(2)	0,1377	8,17		
42(3)	0,1385	8,22		
43(1)	0,0793	4,83	5,03± 0,36	7,09
43(2)	0,0899	5,44		
43(3)	0,0789	4,81		
44(1)	0,1120	6,70	6,58± 0,22	3,41
44(2)	0,1124	6,73		
44(3)	0,1054	6,33		
45(1)	0,0719	4,41	4,59± 0,17	3,76
45(2)	0,0779	4,75		
45(3)	0,0755	4,62		
46(1)	0,1171	6,99	6,58± 0,36	5,49
46(2)	0,1076	6,45		
46(3)	0,1051	6,31		
47(1)	0,0992	5,97	6,22± 0,24	3,91
47(2)	0,1077	6,46		
47(3)	0,1038	6,23		
48(1)	0,0923	5,60	5,74± 0,15	2,55
48(2)	0,0974	5,89		
48(3)	0,0944	5,72		
49(1)	0,1405	8,35	8,59± 0,21	2,48
49(2)	0,1476	8,76		
49(3)	0,1460	8,67		

Tabela h (continuação): Quantificação dos flavonóides totais por espectrofotometria UV-Vis a 510nm

Amostra (Réplica)	Abs 510nm (mAU)	[mg eq CAT/L]	Média± DP (mg eq CAT/L)	DPr (%)
50(1)	0,1247	7,45	7,43± 0,28	3,77
50(1)	0,1247	7,45		
50(2)	0,1291	7,70		
51(1)	0,1143	6,83	6,80± 0,17	2,52
51(2)	0,1163	0,1163		
51(3)	0,1104	0,1104		

Nota: Não havia quantidade suficiente para o doseamento de flavonóides totais na 24

Tabela i: Reta de calibração da quercetina para quantificação dos flavonóis totais a 360nm, por HPLC-DAD

Concentração (ppm).	Área do pico
0,5	126197
1	256313
2	549814
3	795932
5	1276832
7,5	1914404
10	2612810
12,5	3190059
15	3626261
17,5	4349080
20	4896156
25	6314717

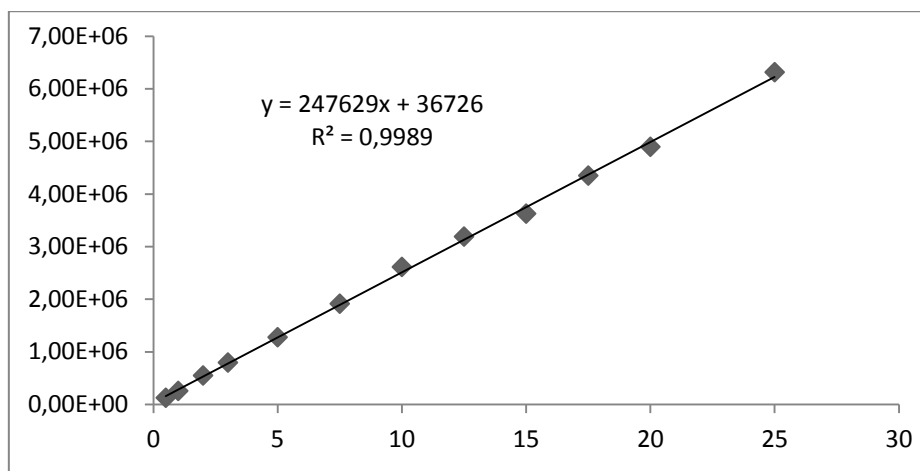
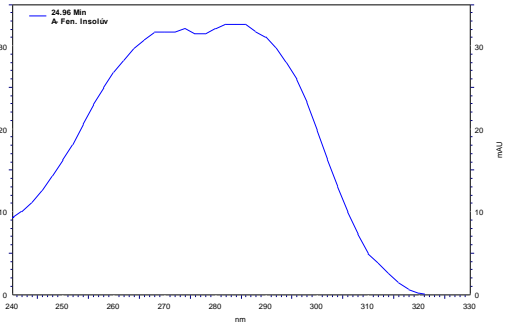
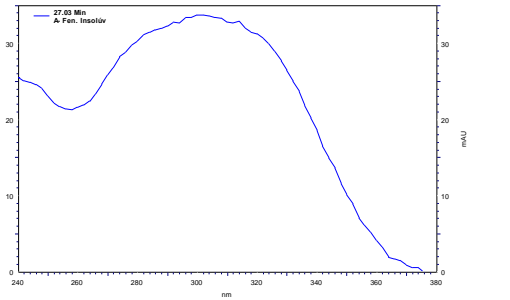
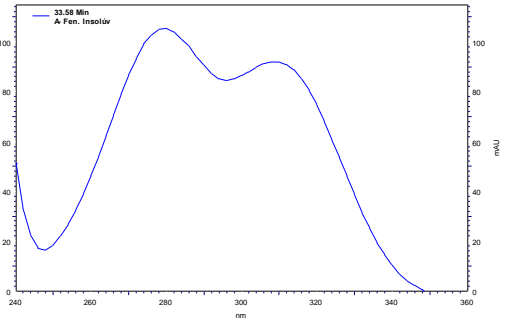
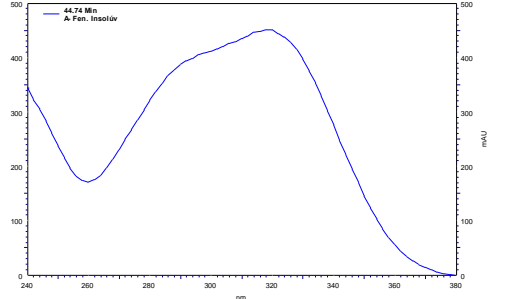
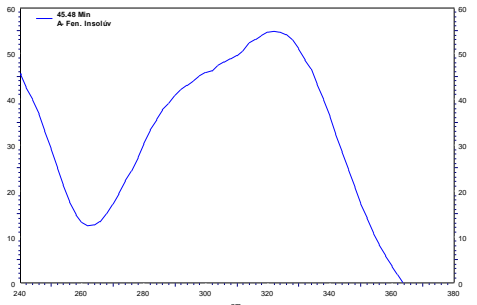
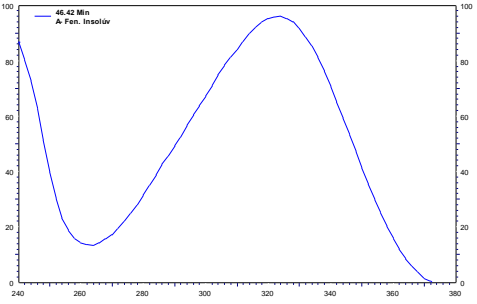
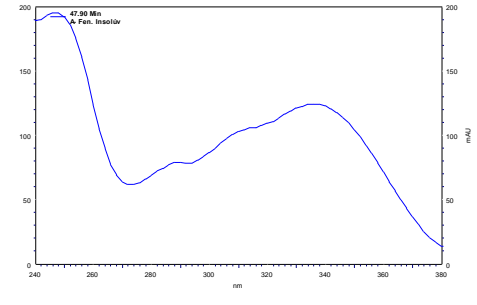
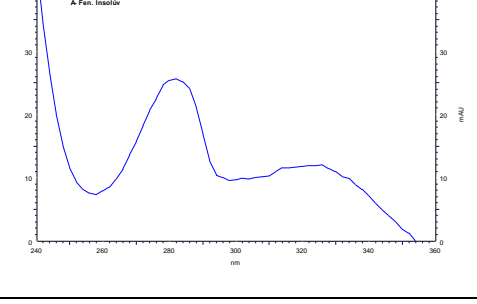
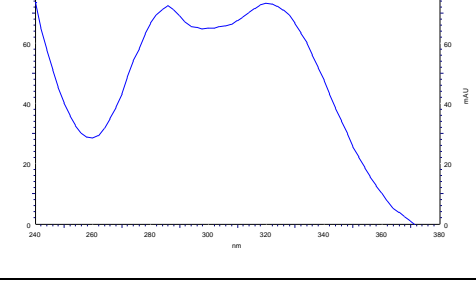


Figura d: Reta de calibração da quercetina obtida por HPLC-DAD a 360nm

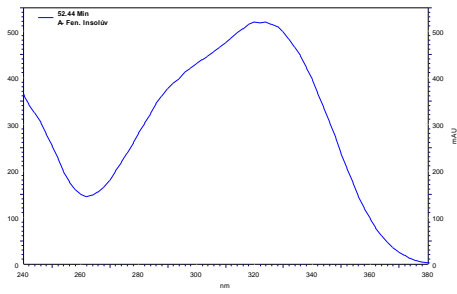
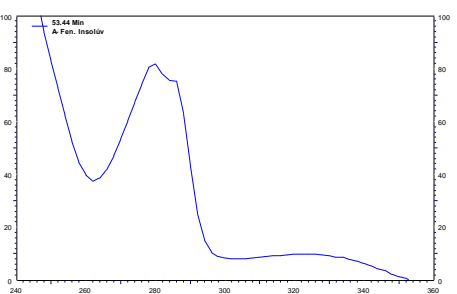
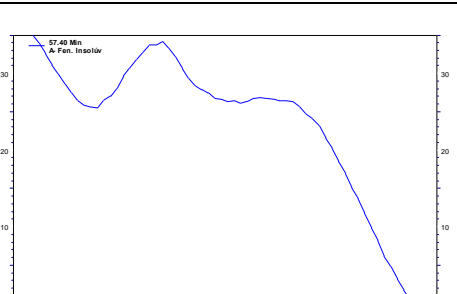
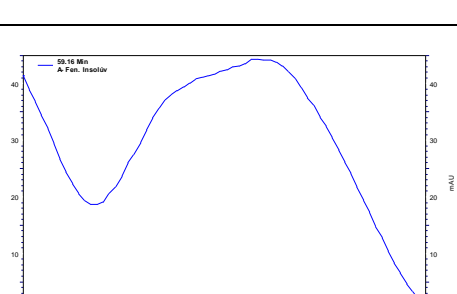
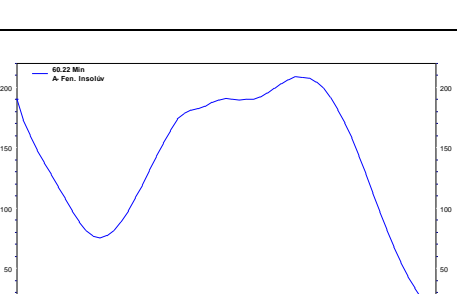
Tabela j: Espectro UV-Vis e tempo de retenção dos diferentes compostos detetados na fração dos compostos insolúveis na experiência da hidrólise

Tempo de retenção (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Espectro UV-Vis
24.96	270; 285	
27.03	303	
33.58	279; 310	
44.74	319; 293	

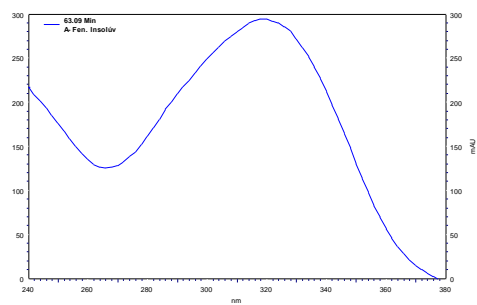
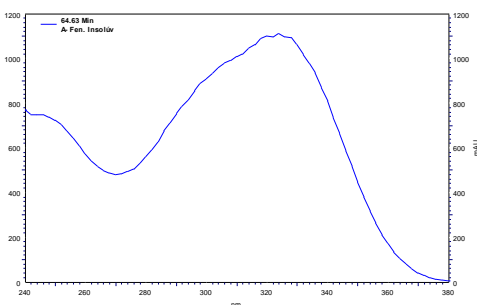
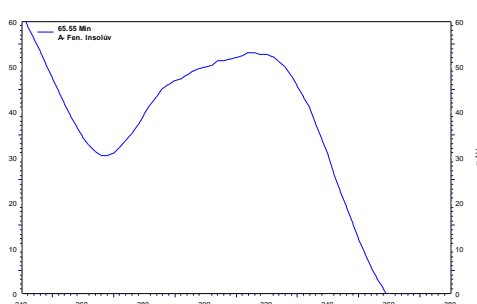
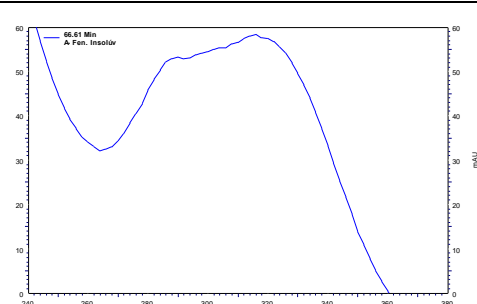
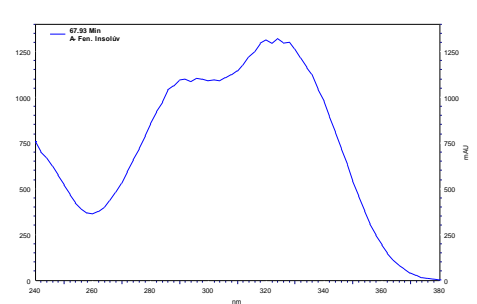
Estudo de diferentes variedades de milho utilizadas na produção de Broa

45.48	322; 298	 <p>45.48 Min A Fen. Insolúv</p>
46.42	323	 <p>46.42 Min A Fen. Insolúv</p>
47.90	336; 310; 288	 <p>47.90 Min A Fen. Insolúv</p>
49.78	282; 326	 <p>49.78 Min A Fen. Insolúv</p>
51.09	286; 321	 <p>51.09 Min A Fen. Insolúv</p>

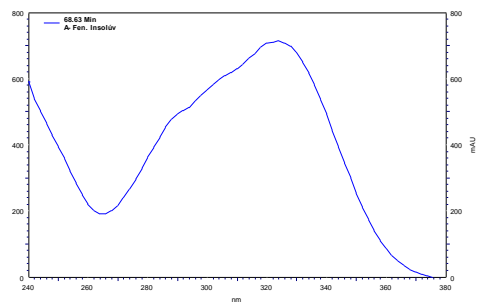
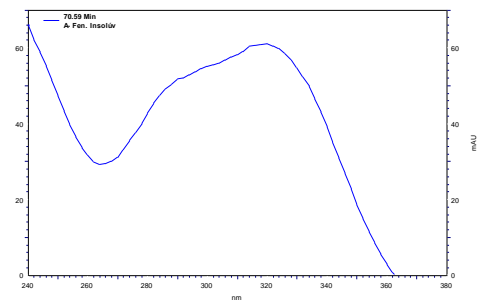
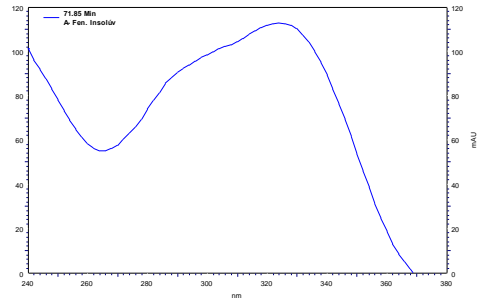
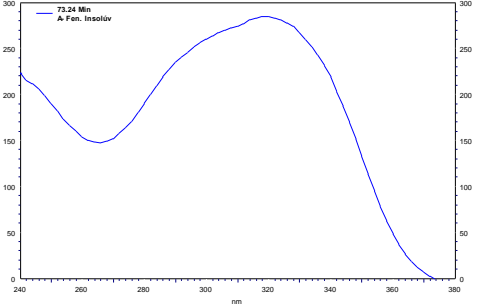
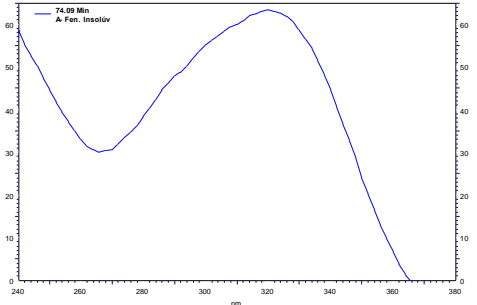
Estudo de diferentes variedades de milho utilizadas na produção de Broa

52.44	297; 322	 <p>52.44 Min A Fen. Insolúv</p>
53.44	280; 286; 326	 <p>53.44 Min A Fen. Insolúv</p>
57.40	286; 320	 <p>57.40 Min A Fen. Insolúv</p>
59.16	293; 319	 <p>59.16 Min A Fen. Insolúv</p>
60.22	297; 322	 <p>60.22 Min A Fen. Insolúv</p>

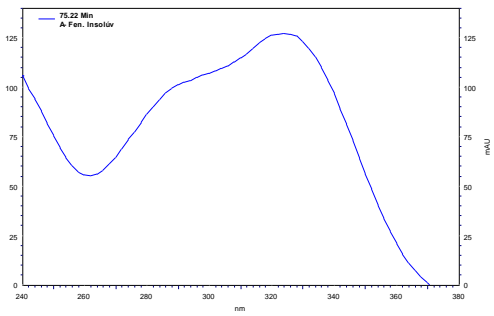
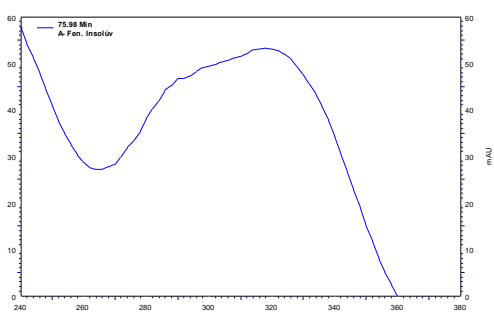
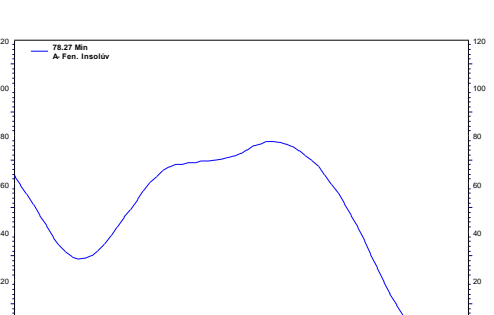
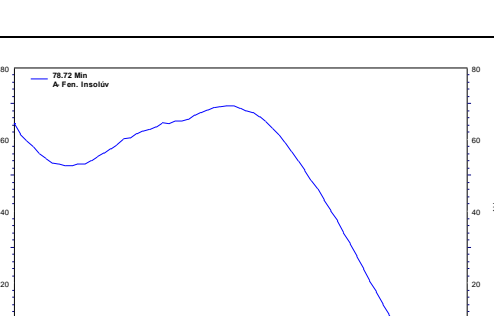
Estudo de diferentes variedades de milho utilizadas na produção de Broa

63.09	320	
64.63	324	
65.55	293; 315	
66.61	289sh; 315	
67.93	290; 324	

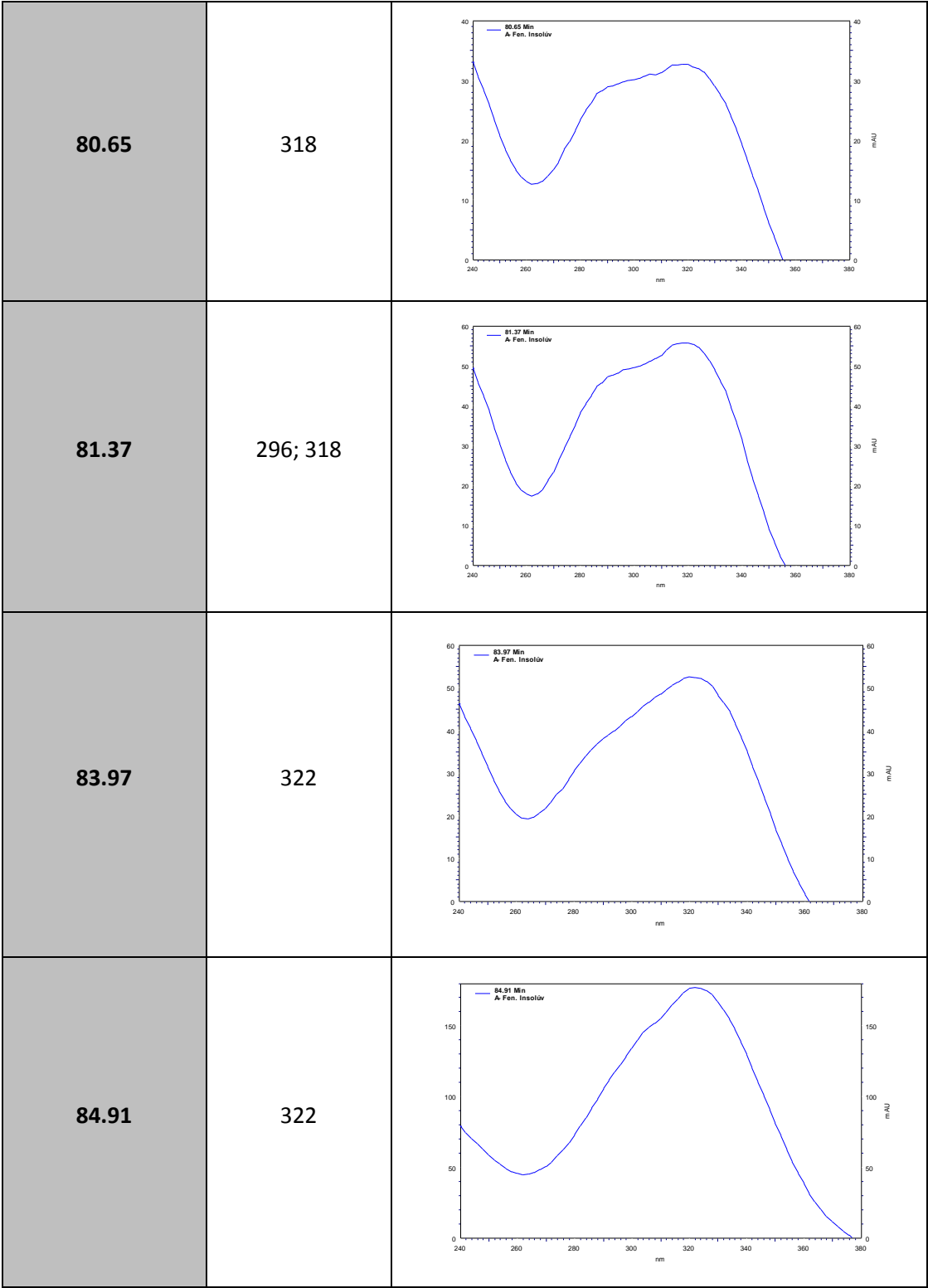
Estudo de diferentes variedades de milho utilizadas na produção de Broa

68.63	324	
70.59	291; 318	
71.85	294; 324	
73.24	320	
74.09	318	

Estudo de diferentes variedades de milho utilizadas na produção de Broa

75.22	291; 324	 <p>75.22 Min A Fen. Insolúv</p>
75.98	290; 318	 <p>75.98 Min A Fen. Insolúv</p>
78.27	290; 320	 <p>78.27 Min A Fen. Insolúv</p>
78.72	308	 <p>78.72 Min A Fen. Insolúv</p>

Estudo de diferentes variedades de milho utilizadas na produção de Broa



Estudo de diferentes variedades de milho utilizadas na produção de Broa

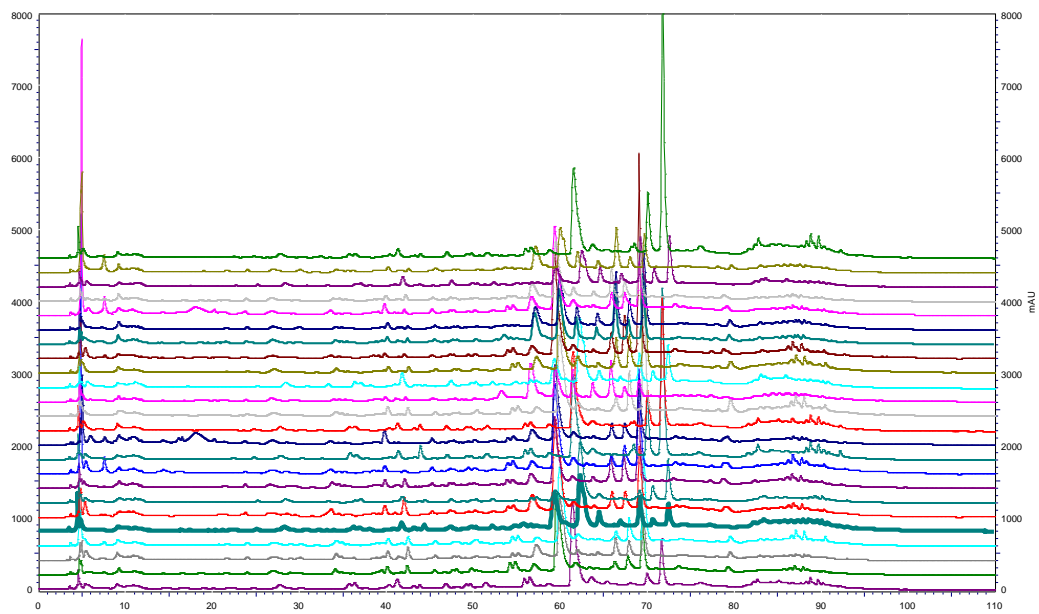
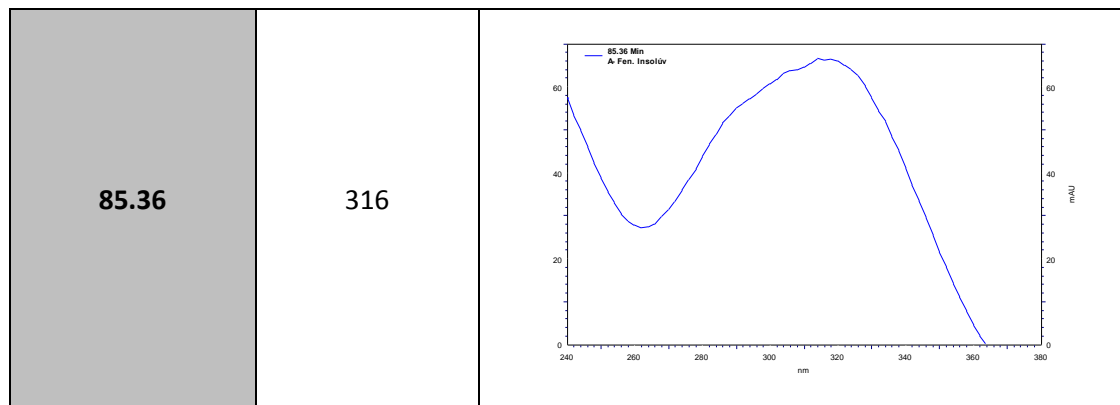


Figura e: Sobreposição dos perfis obtidos das amostras (1 a 24) a 280nm

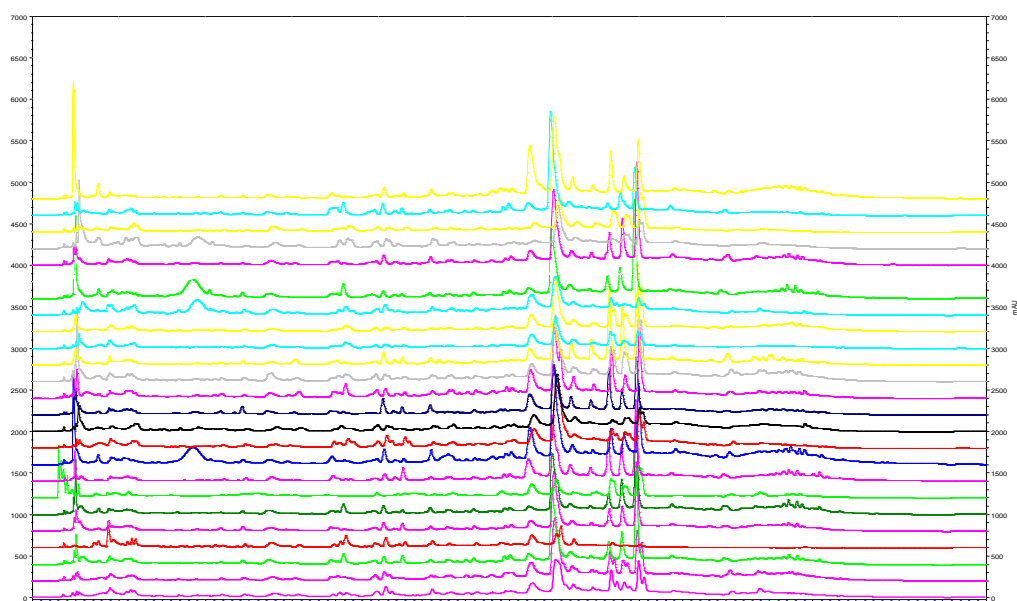
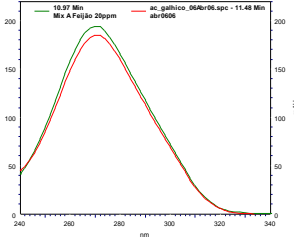
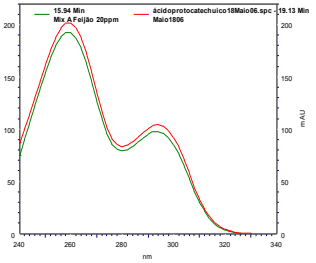
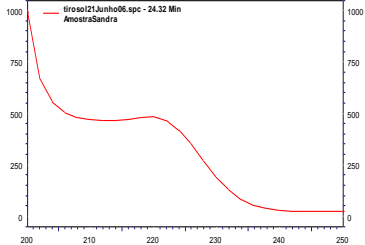
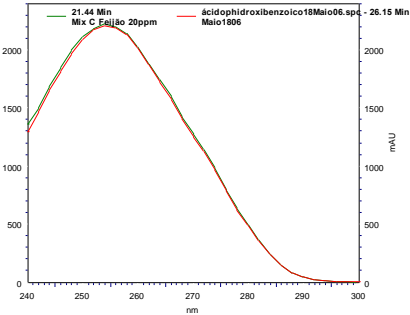


Figura f: Sobreposição dos perfis obtidos das amostras (amostra 25 a 51) a 280nm

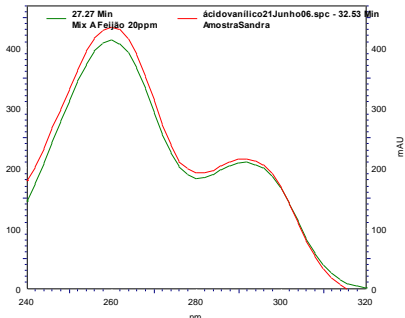
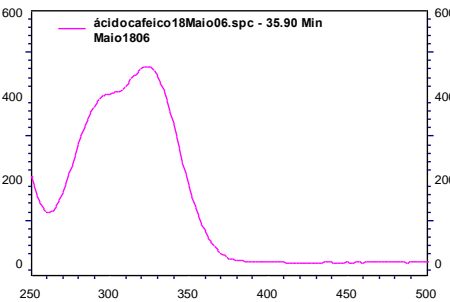
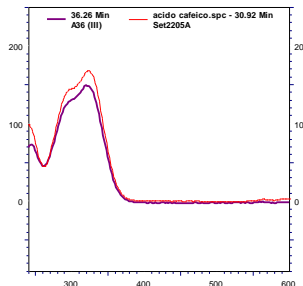
Tabela k: Compostos pesquisados nas amostras, por sobrecarga com mistura de padrões, bem como os espectros e a referência bibliográfica

Nº do pico	Tempo de retenção (min)	Possível identificação	Espetro UV/Vis padrão	λmáx absorção (nm) (valores aproximados)	Espetro UV/VIS padrão/Amostra	Bibliografia
1	11,3	Ácido gálico		270	S.S.	
2	20,33	Ácido protocatechuico		260; 297	S.S.	Mohsen & Ammar, 2009; Mora Rochin, <i>et al.</i> , 2010; Pedreschi & Cisneros-Zevallos, 2007

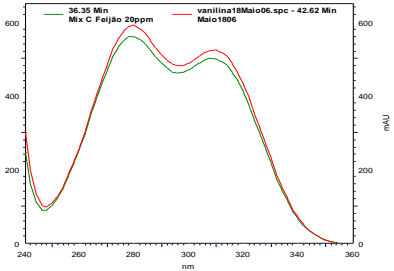
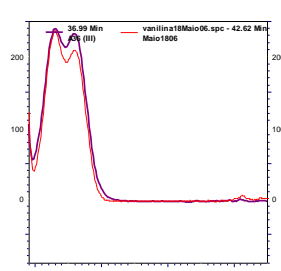
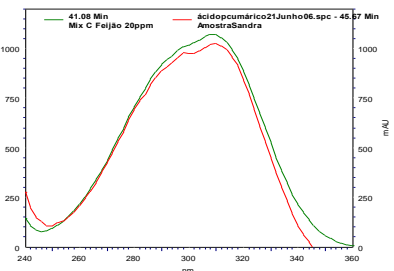
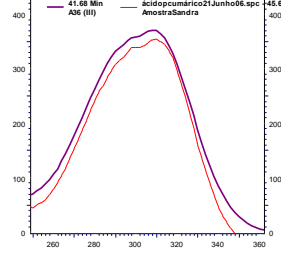
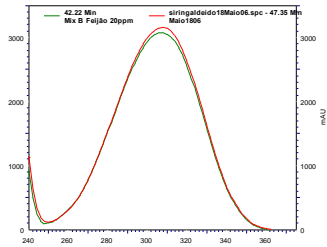
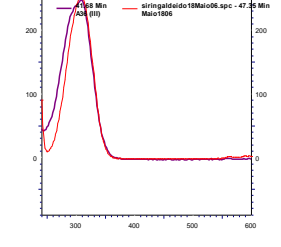
Estudo de diferentes variedades de milho utilizadas na produção de Broa

3	21,3	Tirosol	 <p>Chromatogram of Tirosol. The x-axis represents time in minutes (200 to 250), and the y-axis represents intensity (0 to 1000). A single sharp peak is observed at 24.32 minutes, labeled 'Tiroso121Junho06.spc - 24.32 Min' and 'Amostra Sandra'.</p>	270	S.S.	
4	22,09	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	 <p>Chromatogram of Ácido <i>p</i>-hidroxibenzóico. The x-axis represents time in minutes (240 to 300), and the y-axis represents intensity (0 to 2000). A single sharp peak is observed at 26.15 minutes, labeled 'ácido p-hidroxibenzóico18Maio06.spc - 26.15 Min' and 'Maio1806'.</p>	255	S.S.	Mohsen & Ammar, 2009; Mora Rochin, <i>et al.</i> , 2010; Pedreschi & Cisneros-Zevallos, 2007

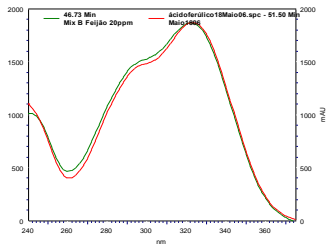
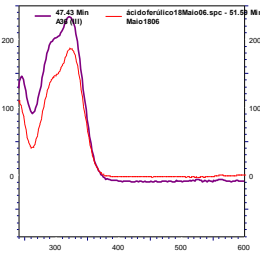
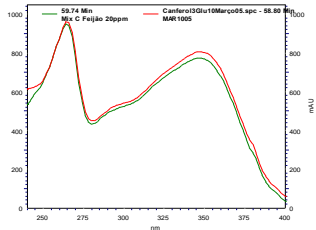
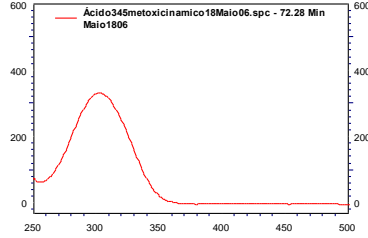
Estudo de diferentes variedades de milho utilizadas na produção de Broa

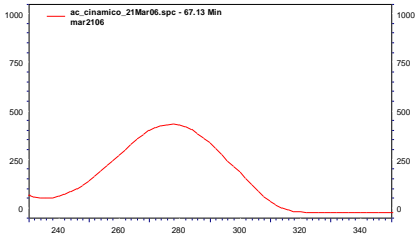
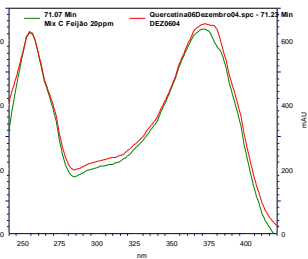
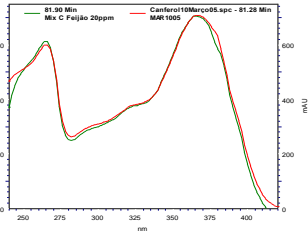
5	27,41	Ácido vanílico		261; 293	s.s.	Mohsen & Ammar, 2009; Mora Rochin, <i>et al.</i> , 2010; Pedreschi & Cisneros-Zevallos, 2007
6	36,26	Ácido cafeico		350		

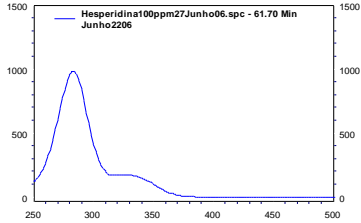
Estudo de diferentes variedades de milho utilizadas na produção de Broa

7	38,99	Vanilina		278; 313		
8	41,69	Ácido <i>p</i> -cumárico		310		Mohsen & Ammar, 2009; Mora Rochin, <i>et al.</i> , 2010; Pedreschi & Cisneros-Zevallos, 2007
9	43	Siringaldeído		308		

Estudo de diferentes variedades de milho utilizadas na produção de Broa

10	47,44	Ácido ferúlico		322		Mohsen & Ammar,2009; Mora Rochin, <i>et al.</i> , 2010; Pedreschi & Cisneros-Zevallos, 2007
11	59,61	Canferol 3-O-Glucósido		265; 350	s.s.	
12	66,90/ 67,31	Ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico		310	s.s.	Mohsen & Ammar,2009; Mora Rochin, <i>et al.</i> , 2010; Pedreschi & Cisneros-Zevallos, 2007

13	69,20	Ácido cinâmico			S.S.	Mohsen & Ammar, 2009; Mora Rochin, <i>et al.</i> , 2010; Pedreschi & Cisneros-Zevallos, 2007
14	71,07	Quercetina		255; 374	S.S.	Mohsen & Ammar, 2009; Mora Rochin, <i>et al.</i> , 2010; Pedreschi & Cisneros-Zevallos, 2007
15	82.95	Canferol		267; 369	S.S.	

16	88.79	Hespiridina		198;289	S.S.	<p>Mohsen & Ammar,2009; Mora Rochin, <i>et al.</i>, 2010; Pedreschi & Cisneros-Zevallos, 2007</p>
----	-------	-------------	--	---------	------	---

s.s.- sem semelhança:não existe semelhança entre o espectro padrão e o pico pesquisado na amostra

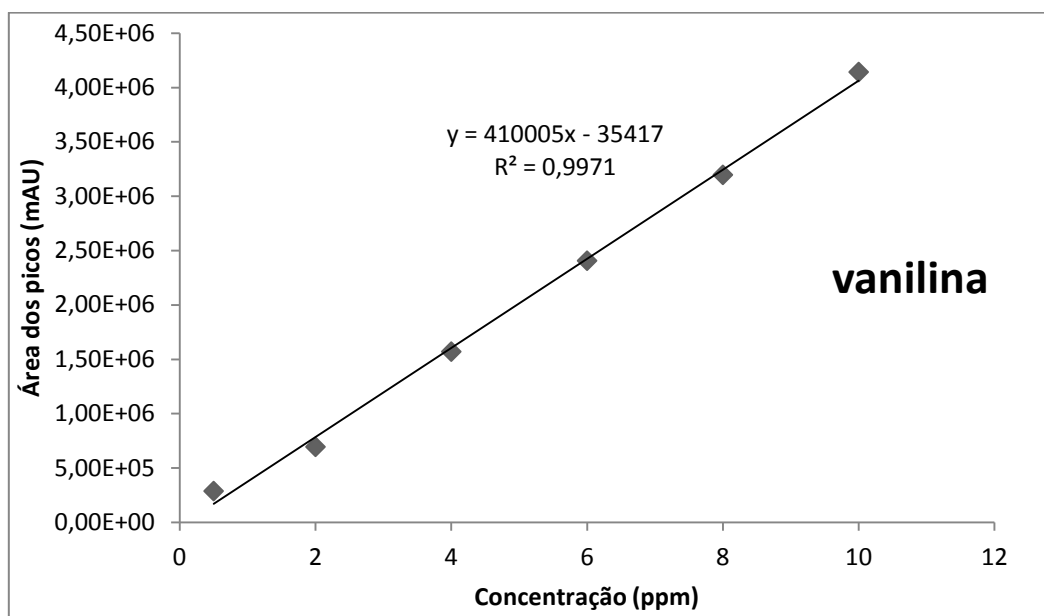


Figura g: Reta de calibração da vanilina obtida por HPLC-DAD a 280nm

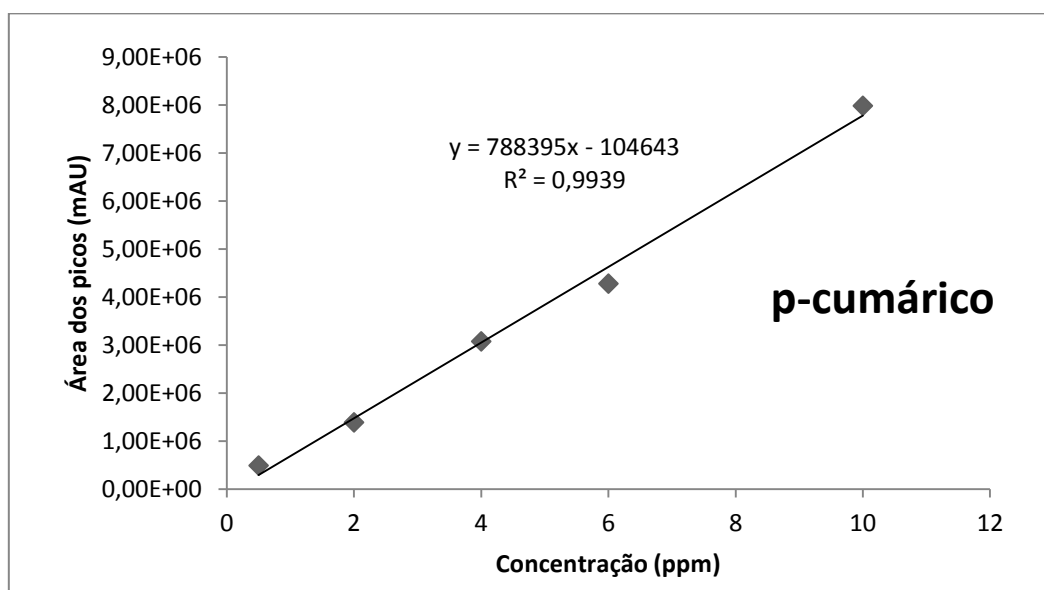


Figura h: Reta de calibração do ácido *p*-cumárico obtida por HPLC-DAD a 280nm

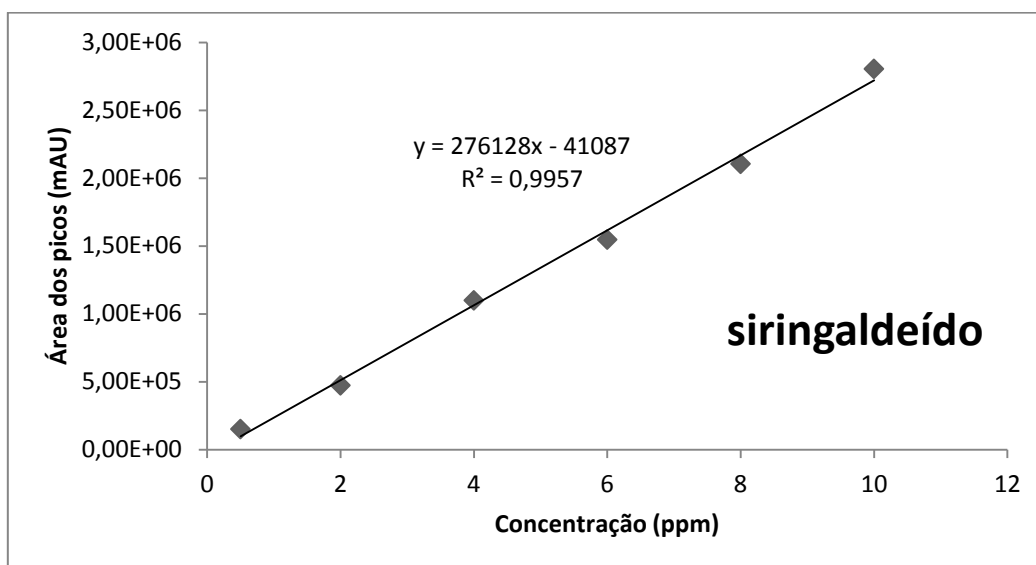


Figura i: Retra de calibração do siringaldeído obtida por HPLC-DAD a 280nm

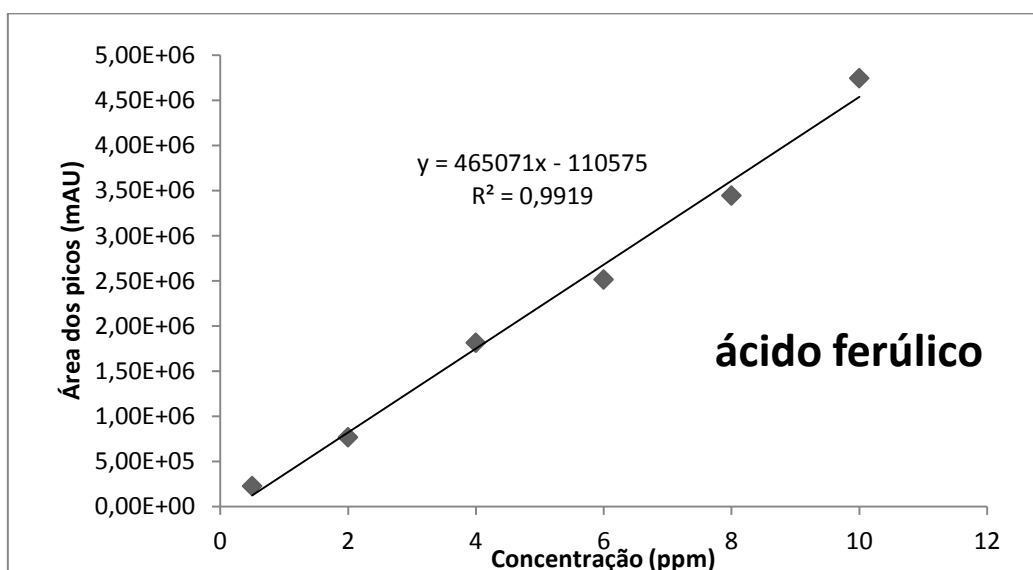


Figura j: Retra de calibração do ácido ferúlico obtida por HPLC-DAD a 280nm

Tabela I: Área, desvio padrão e desvio padrão relativo obtidos para cada pico mencionado e áreas totais para cada amostra obtidas por HPLC-ED

Amostra	Pico	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	Áreas
	Tr (min)	24,85	27,9	30,1	35,367	47	52,917	61,033	63,267	67,567	68,967	70,3	totais
3	Área	3,94 ± 0,12	0,70 ± 0,28	2,89 ± 0,27	6,18 ± 0,72	2,26 ± 0,22	0,79 ± 0,19	4,22 ± 0,92	0,43 ± 0,24	3,58 ± 0,31	2,34 ± 0,47	8,23 ± 0,94	35,57 ± 2,30
	DPr (%)	3,03	40,18	9,31	11,65	9,83	24,23	21,83	55,50	8,68	20,06	11,38	6,46
4	Área	4,45 ± 0,72	0,45 ± 0,27	3,07 ± 0,26	4,26 ± 0,53	2,65 ± 0,61	1,38 ± 0,50	2,48 ± 0,78	0,12 ± 0,21	1,54 ± 0,20	2,01 ± 0,50	13,26 ± 1,15	35,67 ± 3,96
	DPr (%)	16,25	60,24	8,46	12,55	22,89	36,08	31,21	173,21	12,85	24,97	8,65	11,10
9	Área	2,52 ± 0,36	0,00	3,33 ± 0,27	3,94 ± 0,60	3,09 ± 0,42	0,48 ± 0,11	2,88 ± 0,71	0,00	3,23 ± 0,73	2,48 ± 0,55	14,73 ± 1,68	36,69 ± 3,01
	DPr (%)	14,07	0,00	8,24	15,12	13,63	23,94	24,65	0,00	22,57	22,16	11,37	8,20
10	Área	2,61 ± 0,40	0,80 ± 0,36	2,44 ± 0,46	4,25 ± 0,48	1,63 ± 0,33	1,03 ± 0,01	2,62 ± 0,21	0,00	0,00	1,41 ± 0,70	0,00	16,79 ± 2,53
	DPr (%)	15,39	44,38	18,78	11,22	20,41	1,44	7,94	0,00	0,00	49,48	0,00	15,06
13	Área	2,80 ± 0,29	0,16 ± 0,15	1,82 ± 0,08	2,86 ± 0,51	2,30 ± 0,54	1,58 ± 0,13	1,56 ± 0,95	0,33 ± 0,36	2,04 ± 0,28	2,89 ± 0,50	14,61 ± 1,95	32,95 ± 3,05
	DPr (%)	10,35	94,97	4,23	17,79	23,58	8,21	60,87	109,68	13,61	17,36	13,38	9,24
16	Área	1,86 ± 0,06	0,20 ± 0,24	1,56 ± 0,22	3,29 ± 0,42	1,73 ± 0,48	0,93 ± 0,60	1,64 ± 0,38	0,51 ± 0,02	3,33 ± 0,73	2,57 ± 0,24	12,39 ± 1,58	30,00 ± 2,98
	DPr (%)	3,28	123,58	14,22	12,63	27,77	64,06	22,87	3,51	21,76	9,23	12,74	9,93

Estudo de diferentes variedades de milho utilizadas na produção de Broa

17	Área	2,19 ± 0,10	0,00	1,72 ± 0,13	2,07 ±	1,03 ± 0,21	0,86 ± 0,24	2,31 ± 0,47	0,02 ± 0,04	4,49 ± 0,11	3,55 ± 0,52	16,00 ± 1,94	34,24 ± 2,36
	DPr (%)	4,53	0,00	7,61	13,62	20,28	27,71	20,54	173,21	2,47	14,71	12,11	6,90
18	Área	2,26 ± 0,36	0,31 ± 0,09	1,38 ± 1,10	2,35 ± 1,16	1,62 ± 0,34	0,95 ± 0,10	1,20 ± 0,46	2,20 ± 0,46	5,84 ± 1,02	1,27 ± 0,19	8,60 ± 2,39	27,99 ± 6,51
	DPr (%)	16,01	30,07	79,44	49,38	20,70	10,99	37,94	20,99	17,48	14,62	27,73	23,25
19	Área	1,86 ± 0,76	0,16 ± 0,14	0,72 ± 0,40	1,23 ± 0,40	1,29 ± 0,10	0,25 ± 0,22	0,61 ± 0,62	2,05 ± 0,16	5,61 ± 0,55	1,55 ± 0,43	5,66 ± 1,94	20,99 ± 4,32
	DPr (%)	40,99	86,96	55,83	32,18	7,62	90,24	101,68	7,92	9,84	27,88	34,26	20,59
21	Área	2,39 ± 0,28	0,05 ± 0,08	0,98 ± 0,03	1,51 ± 0,14	1,07 ± 0,47	0,25 ± 0,16	1,39 ± 0,36	1,60 ± 0,56	4,69 ± 1,22	1,08 ± 0,30	5,53 ± 1,92	20,53 ± 3,75
	DPr (%)	11,84	143,64	3,38	9,09	43,75	62,48	25,71	35,10	26,05	27,91	34,72	18,29
24	Área	1,86	0,03	1,45	1,45	2,28	0,93	0,00	1,63	5,98	0,54	1,67	17,82
27	Área	3,86 ± 0,23	0,45 ± 0,06	1,99 ± 0,06	2,73 ± 0,28	1,54 ± 0,12	0,90 ± 0,12	4,07 ± 1,38	0,05 ± 0,09	2,59 ± 0,09	2,06 ± 0,30	13,24 ± 1,02	33,49 ± 1,60
	DPr (%)	5,95	13,94	2,84	10,44	8,07	13,41	33,90	173,21	3,34	14,54	7,70	4,78
28	Área	3,34 ± 0,01	1,48 ± 0,58	1,79 ± 1,01	3,20 ± 1,69	1,13 ± 0,53	0,55 ± 0,05	3,48 ± 2,39	1,79 ± 1,05	7,86 ± 5,37	0,73 ± 1,03	4,76 ± 6,73	30,11 ± 19,37
	DPr (%)	0,40	59,37	56,27	62,65	47,43	9,58	120,18	58,47	123,07	141,42	141,42	80,35

Estudo de diferentes variedades de milho utilizadas na produção de Broa

31	Área	2,36 ± 0,04	0,46 ± 0,63	0,45 ± 0,64	0,93 ± 0,01	0,89 ± 0,25	1,48 ± 0,43	1,44 ± 0,12	1,55 ± 0,05	7,49 ± 2,42	0,70 ± 0,12	2 ± 0,65	19,76 ± 4,24
	DPr (%)	1,86	136,49	139,87	1,14	27,43	28,93	8,32	3,32	32,34	16,69	63,85	21,45
38	Área	4,55 ± 0,43	0,66 ± 0,11	1,02 ± 0,27	1,46 ± 0,36	2,20 ± 0,20	0,17 ± 0,15	2,54 ± 0,74	0,10 ± 0,18	1,82 ± 0,04	2,32 ± 0,22	2,72 ± 0,94	19,56 ± 2,28
	DPr (%)	9,39	16,50	26,49	24,88	9,07	88,87	29,15	173,21	2,42	9,58	17,92	11,66
43	Área	2,51 ± 0,25	0,67 ± 0,74	0,93 ± 0,11	1,43 ± 0,09	1,05 ± 0,92	0,50 ± 0,43	1,57 ± 0,2,	1,88 ± 0,61	0,76 ± 0,15	0,44 ± 0,07	2,22 ± 0,30	13,96 ± 1,59
	DPr (%)	10,08	111,36	12,18	6,30	88,02	86,60	13,77	32,68	20,03	16,21	28,04	11,41
45	Área	5,11 ± 1,20	0,29 ± 0,11	0,75 ± 0,25	0,97 ± 0,39	1,44 ± 0,27	0,94 ± 0,45	3,27 ± 0,94	0,06 ± 0,10	2,15 ± 0,24	1,45 ± 0,38	8,16 ± 1,84	24,60 ± 5,79
	DPr (%)	23,40	38,34	33,09	40,78	18,89	48,31	28,65	173,21	11,33	26,56	22,56	23,55
49	Área	2,92 ± 0,17	2,22 ± 2,03	1,86 ± 0,23	2,63 ± 0,44	2,50 ± 0,13	0,47 ± 0,54	1,63 ± 0,81	0,01 ± 0,02	4,59 ± 2,61	2,72 ± 0,41	2,38 ± 0,68	23,94 ± 3,40
	DPr (%)	5,86	91,40	12,51	16,57	5,10	114,67	49,47	109,05	56,84	14,96	57,41	14,19

A-55

Anexos V

Poster no âmbito do trabalho apresentado em “SOLIBAM Stakeholders Congress”,

San Nilo Abbey, Roma, Itália, Abril 2012

